

ga. 2006760

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

**THESE**

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

par

Edith BONNELYE

**ETUDE DU RÔLE BIOLOGIQUE DE DEUX RÉCEPTEURS  
NUCLÉAIRES ORPHELINS:  
Rev-erb $\beta$  ET ERR-1.**



Soutenue le 5 décembre 1997 devant la commission d'examen:

<b>Président:</b>	<b>Pr. Xavier DESBIENS</b>
<b>Rapporteurs:</b>	<b>Pr. Walter WAHLI</b> <b>Dr. Pierre JURDIC</b>
<b>Examineurs:</b>	<b>Dr Bernard THISSE</b> <b>Pr. Vincent LAUDET</b> <b>Pr. Dominique STEHELIN</b>

A mes parents, ma mamie...

A ma zouzou.

## REMERCIEMENTS

C'est après quatre années d'études dans ma tendre Auvergne que j'ai atterri pour cinq années dans le laboratoire de Dominique Stéhelin que je remercie ici pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire.

Je remercie les membres du jury d'avoir bien voulu accorder un peu de leur temps à la lecture de ce travail. Je suis très sensible au fait qu'ils aient accepté de le juger.

Je tiens tout particulièrement à remercier Vincent Laudet pour avoir pris le risque de m'accepter dans son équipe, moi petite corrézienne venant de sa campagne avec un panier rempli de champignons comme le dit Catherine. Je tiens à faire remarquer ici que c'est avec un déchirement de coeur indescriptible que j'ai abandonné mes sabots à mon arrivée à Pasteur! Merci Chef, Chef, non pas pour « le mammifère placentaire » dont tu m'as gentiment qualifiée à ton habilitation (celle-là je ne l'ai toujours pas avalée !) mais pour m'avoir ...« mise sur les rails » ...Et Toc!

Tout ce travail mené sur les récepteurs nucléaires m'a permis de rencontrer et de collaborer avec un certain nombre de personnes. Je tiens à remercier ici Barbara Demeneix et son équipe au Muséum National d'Histoire Naturelle, ainsi que toute l'équipe « zebrafish » à l'IGBMC à Illkirch, Christine et Bernard Thisse, Max, Tania, Vincent, Dominique et Odile. Je n'oublierai jamais que le moment le plus important dans la vie ce n'est ni la naissance, ni le mariage mais c'est la Gastrulation!!! Je tiens aussi à remercier tout le SN3 et tout particulièrement Xavier qui m'a initié à l'embryologie et Eric pour nos nombreuses collaborations. Je tiens aussi à remercier Brigitte Fournier. Enfin je tiens à remercier l'équipe de Bart Staels et tout particulièrement Philippe et Inès pour m'avoir initiée au rythme circadien ( alors Philippe, le zebra tu l'as ramassé ou pas?) et bien sûr un grand merci à Odile (la page ne serait pas assez grande...).

Un grand merci à Marie-Christine et à Nini pour leur aide et pour la correction de mes innombrables fautes d'orthographe. Merci aussi à Chopinette qui m'a initiée aux joies du gel shift et aux sablés paternel lors des pauses cafés (Oh ça c'est pas bien!) sans oublier notre duo d'enfer sur le « Lèche bottes Blues » d'un certain Mr Eddy ! Merci aussi à Nathalie Spruyt grâce à qui « l'opération zebra » a littéralement décollé (Nathalie on t'a déjà dit cent fois qu'on ne dit pas cassette mais disquette ! tu es toujours aussi sourde ?). Merci à Carole, Oriane, Thomas et Celine

pour tous les coups de main pour les séquences. Amusez-vous bien à Lyon. Merci de m'avoir attendue pour ton pot, Celine ! Merci à Rachid « système » (bon maintenant que tu as deux femmes à la maison arrêtes de faire la « teuf » ( un, dos, tres...)). Merci à Jean-Marc pour toutes les gentillesse divulguées à l'égard de toutes les filles du groupe, du style « gros boudin, et ta taille c'est du 50 » ou encore, « ah oui cette année c'est la mode du tee-shirt large !!! ». Merci à Hector, ici la fille de la campagne (non je t'ai déjà dit que ce schisto je ne l'accrocherai pas à côté de la croix chrétienne !). Merci à Fati pour tout et surtout pour les moments privilégiés à déguster sa cuisine. Merci à Albin pour toute cette bonne humeur et les grimaces à la fenêtre de, oserai-je le dire, mon placard à balai, comme le nomme Papi, que je remercie au passage pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et pour toutes ces discussions sur la pêche ! Merci à Sophana dit l'OSS que je ne traduirai pas de peur de le faire condamner à vie. Merci à tous les compagnons de l'ancien fumoir Jean-Luc, Didier, Yvan et Laurent (Laurent si tu m'en sors encore une sur l'assos qui me finance je t'étrangle (même si je crois cette mission complètement irréalisable)). Merci à toutes les dames de la laverie pour toutes ces journées, qui grâce à vous toutes, ont commencé dans la bonne humeur (Thérèse c'est une tarte aux abricots et pas à la tomate!!!) Merci à tous les compagnons de la paillasse café surtout en cette période studieuse (bon alors, Anne-Claire, un cèpe c'est pas dur...). Merci à Jean pour tous ses bons conseils. Merci à Martine (il faut absolument que j'aille à Auvers...voir Vincent et son frère enlacés à jamais par des branches de lierre et ça rime!). Merci à Catherine (bon maintenant que Spielberg en a sorti un deuxième sur les Dinos, tu t'y mets quand?). Merci à toute l'équipe schisto et plus particulièrement à Ricardo et Didier. Et surtout un grand merci à Agnès pour les « schtouilles » (ça existe dans le dictionnaire ?) et pour avoir été la compagne de tous les combats à coups de rondelles, d'exon 9 et d'exon F afin de résoudre le mystère du chevauchement!!!

Je tiens, enfin, à remercier la région Nord/Pas de Calais, l'Institut Pasteur de Lille et l'ARC pour leur soutien financier.

Merci à tous.

*Sois humble ! que t'importe le riche et le puissant*

*Un souffle les emporte.*

*La force la plus forte c'est un coeur innocent.*

Victor Hugo

# SOMMAIRE DETAILLE

<b>RESUME</b> .....	6
<b>PUBLICATIONS</b> .....	7
<b>ABREVIATIONS</b> .....	8
<b>PRESENTATION DU MEMOIRE</b> .....	10
<b>I - <u>INTRODUCTION</u></b> .....	13
<b>INTRODUCTION GENERALE : COMMUNICATION CELLULAIRE</b> .....	14
<b>1ère PARTIE : LA FAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES</b> .....	15
<b>1) DEFINITION</b> .....	15
<b>2) PRESENTATION DE LA SUPERFAMILLE</b> .....	15
<b>3) FIXATION À L'ADN ET DIMERISATION DES RECEPTEURS</b> .....	16
3.1) Fixation des récepteurs nucléaires sur des répétitions directes.....	17
3.2) Fixation des récepteurs nucléaires sur d'autres éléments.....	18
<b>4) ORGANISATION GENERALE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES</b> .....	19
4.1) Le domaine A/B .....	21
4.1.1) Fonction transactivatrice de la région AF-1 .....	21
4.1.2) Régulation de la fonction AF-1.....	21
4.2) Le domaine C.....	22
4.2.1) Structure en doigt de zinc .....	22
4.2.2) La boîte P .....	23
4.2.3) La boîte D.....	23
4.2.4) Les boîtes T et A .....	25
4.2.5) Rôle du ligand dans la fixation à l'ADN .....	26
4.3) Le domaine D.....	26
4.4) Le domaine E .....	27
4.4.1) Structure tridimensionnelle du domaine E .....	28
4.4.2) La dimérisation.....	29
4.4.3) La fixation du ligand.....	30
4.4.4) Changement conformationnel induit par la fixation du ligand .....	31

4.4.5) Le domaine AF2-AD et la transactivation .....	31
4.4.5.1) Localisation du domaine AF2-AD .....	31
4.4.5.2) Fonction du domaine AF2-AD .....	32
4.4.5.3) Effets de la phosphorylation sur le domaine AF2-AD et la fixation de co-activateurs.....	33
4.4.6) Le domaine Ti et la transactivation.....	33
4.5) Le domaine F .....	34
4.6) Les signaux de translocation nucléaire.....	34

## **2ème PARTIE : COMMENT METTRE EN ROUTE UN RECEPTEUR NUCLEAIRE .....**

<b>1) INTERACTION RECEPTEUR NUCLEAIRE-FACTEURS GENERAUX DE TRANSCRIPTION .....</b>	<b>35</b>
1.1) TFIIB.....	36
1.2) TAFII30.....	37
<b>2) INTERACTION RECEPTEUR NUCLEAIRE-CO-ACTIVATEURS.....</b>	<b>37</b>
2.1) Les co-activateurs en général .....	37
2.2) Un exemple de co-activateurs : TIF-2/SRC-1 .....	38
2.3) Les co-intégrateurs : CBP/P300.....	39
<b>3) INTERACTION RECEPTEUR NUCLEAIRE/CO-REPRESSEUR : SMRT ET N-CoR.....</b>	<b>40</b>
3.1) N-CoR.....	40
3.2) SMRT .....	42
3.3) Informations de dernière minute.....	42

## **3ème PARTIE : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES ORPHELINS.....**

<b>1) LIGANDS ET ACTIVATEURS.....</b>	<b>43</b>
1.1) Mise en évidence de ligands .....	43
1.1.1) RXR et PPARs.....	43
1.1.2) Une nouvelle méthode d'identification de ligand : le test CARLA.....	45
1.2) Mise en évidence de molécules activatrices .....	46
<b>2) odr-7, KNI : DES "VRAIS" ORPHELINS .....</b>	<b>47</b>
<b>3) LA PHOSPHORYLATION: UN MODE DE REGULATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES EN ABSENCE DE LIGAND.....</b>	<b>48</b>
3.1) Phosphorylation et activités des récepteurs .....	48
3.2) Phosphorylation et fixation à l'ADN.....	49

<b>4) RECHERCHE DU ROLE BIOLOGIQUE DES RECEPTEURS ORPHELINS</b> .....	50
4.1) Intervention dans des voies de synthèses .....	50
4.2) Régulation de l'activité des récepteurs «classiques» par les récepteurs orphelins .....	50
4.3) DAX-1 et SHP des récepteurs orphelins sans domaine C : un moyen de réguler négativement l'activité de l'hétérodimère RXR-RAR.....	51
<b>5) L'OEUF OU LA POULE</b> .....	52

#### **4ème PARTIE : PRESENTATION DES RECEPTEURS ORPHELINS**

<b>Rev-erb et ERR</b> .....	54
<b>1) LES GROUPES Rev-erb et ROR</b> .....	54
1.1) Le chevauchement c-erbA-1/Rev-erb $\alpha$ .....	54
1.2) Présentation du groupe de gènes Rev-erb/ROR .....	55
1.3) Capacité à fixer l'ADN des récepteurs Rev-erb/ROR.....	56
1.4) Activité transcriptionnelle des récepteurs Rev-erb/ROR.....	56
1.4.1) Les récepteurs Rev-erb sont des represseurs de la transcription .....	56
1.4.2) Interaction des récepteurs Rev-erb avec des co-represseurs .....	57
1.4.3) Action antagoniste des récepteurs Rev-erb et ROR .....	58
1.4.4) Absence du domaine AF2-AD : Comment activer les récepteurs Rev-erb ? .....	59
1.5) Rôle biologique des récepteurs Rev-erb.....	60
<b>2) LES RECEPTEURS ORPHELINS ERR-1 ET ERR-2</b> .....	61
2.1) Mécanisme d'action.....	61
2.1.1) Identification et expression .....	61
2.1.2) Fixation à l'ADN de ERR-1 et ERR-2 .....	62
2.1.3) ERR-1 et ses gènes cibles.....	63
2.2) Les oestrogènes et le métabolisme osseux .....	63
2.2.1) Cycle du remodelage osseux .....	63
2.2.2) Effets des oestrogènes sur le remodelage osseux.....	64
2.2.3) Rôle des oestrogènes sur la production de cytokines et de facteurs de croissances .....	65

<b>II - <u>RESULTATS</u></b> .....	68
<b>1) ARTICLE 1 : Rev-erb<math>\beta</math>, a New Member of the Nuclear Receptor Superfamily, Is expressed in the Nervous System during Chicken Development</b> .....	69
A) Résumé des résultats .....	69
B) Article .....	71
C) Discussion .....	72
1) Rev-erb $\beta$ et les membres de la famille Rev-erb.....	72
1.1) Un point sur le chevauchement.....	72
1.2) Etudes fonctionnelles.....	73
2) Rev-erb $\beta$ et le muscle .....	74
3) Rev-erb $\beta$ et le système nerveux .....	76
4) Résultats complémentaires : identification du Rev-erb $\beta$ de poisson-zèbre.....	78
4.1) Introduction.....	78
4.2) Identification de Rev-erb $\beta$ de poisson-zèbre.....	78
4.3) Etudes fonctionnelles.....	80
<b>2) ARTICLE 2 : The ERR-1 Orphan Receptor is a Transcriptional Activator Expressed During Bone Development</b> .....	82
A) Résumé des résultats .....	82
B) Article .....	85
C) Discussion .....	86
1) ERR-1 et la différenciation ostéoblastique .....	86
2) ERR-1 et l'ostéopontine.....	87
2.1) Rôle de l'ostéopontine.....	87
2.2) Régulation de l'ostéopontine par ERR-1 .....	88
2.3) Rôle de ERR-1 .....	88
3) ERR-1 et les stéroïdes.....	89
3.1) ER, les oestrogènes et le tissu osseux .....	89
3.2) ERR-1 et les stéroïdes.....	90
3.2.1) Recherche du ligand de ERR-1.....	90
3.2.2) Le profil d'expression de ERR-1, un argument en faveur d'une régulation de ERR-1 par les stéroïdes.....	90
4) En conclusion .....	92

<b>3) ARTICLE 3 : Expression of the Estrogen Related Receptor 1 (ERR-1) Orphan Receptor During Mouse Development .....</b>	<b>93</b>
A) Résumé des résultats .....	93
B) Article .....	96
C) Discussion .....	97
1) ERR-1 et ERR-2 .....	97
2) ERR-1 et ER dans la glande mammaire .....	99
3) ERR-1 et la différenciation cellulaire .....	100
3.1) ERR-1 et la différenciation nerveuse et épidermique .....	100
3.2) Les protéines Mad et la différenciation .....	101
4) ERR-1 et SF-1 dans la stéroïdogénèse .....	102
 <b>III - <u>REFERENCES</u>.....</b>	 <b>105</b>

## RESUME

La famille des récepteurs nucléaires est un ensemble de gènes codant des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par un ligand. En plus des récepteurs classiques des hormones stéroïdes, thyroïdiennes ainsi que de l'acide rétinoïque ou de la vitamine D, cette famille comprend un grand nombre de récepteurs dits « orphelins » dans le sens où leur ligand n'a pas encore été identifié. Notre travail a porté sur l'étude du rôle biologique de deux de ces récepteurs orphelins, Rev-erb $\beta$  et ERR-1

Nous avons identifié et caractérisé Rev-erb $\beta$  chez le poulet et le poisson-zèbre. Nous avons montré que ces deux récepteurs sont capables de se fixer sous forme de monomère sur un élément de type RevRE et de réprimer la transcription. Au cours du développement embryonnaire les gènes Rev-erb $\beta$  de poulet et de poisson-zèbre n'ont pas le même profil d'expression. En effet chez le poulet ce gène est exprimé dans tout le système nerveux et particulièrement dans le plancher du tube neural, une structure connue pour réguler la différenciation et le guidage des neurones moteurs. En revanche chez le poisson-zèbre, ce gène est uniquement exprimé dans la glande pinéale et la rétine au cours du développement embryonnaire et son expression varie en fonction du rythme circadien.

La deuxième partie de notre travail a porté sur l'étude de ERR-1 (pour « Estrogen-Related-Receptor-1 »), un récepteur orphelin proche du récepteur des oestrogènes. Nous avons montré que ce gène était fortement exprimé dans l'os en formation ainsi que dans les ostéoblastes. L'étude de la fixation à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de ERR-1 a permis de montrer qu'il était capable de se fixer sous forme de monomère sur un élément SFRE et d'agir comme un activateur de la transcription *via* cet élément. Enfin, dans des cellules ostéoblastiques, ERR-1 s'est avéré être capable de réguler positivement l'expression du gène de l'ostéopontine, une protéine de la matrice osseuse. Il semblerait donc que ERR-1 joue un rôle dans la physiologie osseuse. De plus, l'étude de l'expression de ERR-1 au cours du développement embryonnaire de la souris nous a permis d'associer ERR-1 à des processus de différenciation cellulaire que ce soit dans le tissu osseux, le système nerveux, l'épiderme ou le muscle. Ainsi dans tous ces tissus ERR-1 est exprimé dans des cellules post-mitotiques qui commencent à se différencier. Il semblerait donc que ERR-1 soit associé à des mécanismes de différenciation essentiels pour le développement embryonnaire.

## PUBLICATIONS

\***E.BONNELYE**, JM.VANACKER, X.DESBIENS, A.BEGUE, V.LAUDET and D.STEHELIN.

"Rev-erb $\beta$  a new member of the nuclear receptor gene superfamily is expressed in nervous system during chicken development"  
**Cell Growth & Differentiation** 5, 1994, 1357-1365.

\***E.BONNELYE**, JM.VANACKER, X.DESBIENS, A.BEGUE, J.AUBIN, V.LAUDET and B.FOURNIER.

"The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development." **Molecular Endocrinology** 11, 1997, 905-916.

\***E.BONNELYE**, JM.VANACKER, N. SPRUYT, B.FOURNIER X.DESBIENS and V. LAUDET.

"Expression of the estrogen related receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development." **MOD** 65, 1997, 71-85.

**E.BONNELYE**, O.MARCHAND, P.GERVOIS, B.THISSE, B. STAELS and V.LAUDET.

"zfRev-erb $\beta$ , the zebrafish homolog of the orphan nuclear receptor Rev-erb $\beta$  is modulate by the circadian rhythm." en préparation

**E.BONNELYE**, N.SPRUYT, H.ESCRIVA, B.THISSE and V.LAUDET.

"zfNurr-1, the zebrafish homolog of the orphan nuclear receptor Nurr-1 is also expressed in brain during embryonic development. " en préparation

Ngoc. VU-DAC, S. CHOPIN-DELANNOY, P. GERVOIS, **E.BONNELYE**, K. SCHOONJANS, J. AUWERX, J. C. FRUCHART, V.LAUDET and Bart STAELS.

"The nuclear receptors PPAR $\alpha$  and Rev-erb $\alpha$  mediate the species-distinct regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates " EMBO, soumi

## ARTICLES DE REVUE

**E.BONNELYE** et V. LAUDET.

"Les gènes chevauchants".  
**Médecine/ Sciences**. 10, 1994, 805-816.

**E.BONNELYE** et V. LAUDET

"La chevauchée des gènes".  
**Pour La Science**, 207, 1995, 22

\* Publications présentées dans ce mémoire.

## ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AF	: Domaine d'activation
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
AR	: Récepteur des androgènes
ARN	: Acide ribonucléique
CBP	: CREB Binding protein
COUP-TF	: Chicken Ovalbumin Upsteam Promotor- Transcription Factor
CREB	: cAMP response element-binding protein
Domaine A/B	: domaine amino-terminal
Domaine C	: domaine de liaison à l'ADN
Domaine D	: domaine charnière
Domaine E	: domaine de liaison du ligand
DR	: Répétitions directes (direct repeats)
EcR	: Récepteur de l'ecdysone
EGON	: « embryonic gonad »
ER	: Récepteur des oestrogènes
ERE	: Élément de réponse des récepteurs des oestrogènes.
ERR-1	: Estrogen-Related-Receptor-1
FTZ-FI	: fushi tarazu factor 1
GR	: Récepteur des glucocorticoïdes
HNF4	: Hepatocyte nuclear factor 4
HRE	: Élément de réponse hormonal (« Hormone Responsive Element »)
Hsp	: Protéine de choc thermique
kD	: kiloDalton
MR	: Récepteur des minéralocorticoïdes
N-CoR	: Co-répresseur de récepteurs nucléaires

NGFI-B	: Nerve growth factor induced gene B
odr	: odorant response gene
PAL	: Palindrome
pb	: paire de base
PPAR	: Récepteur du proliférateur des peroxyosomes
PR	: Récepteur de la progestérone
RAR	: Récepteur de l'acide rétinoïque tout- <i>trans</i>
RARE	: Élément de réponse du récepteur de l'acide rétinoïque tout- <i>trans</i>
ROR	: RAR related Orphan Receptor
RVR	: Rev-erb $\alpha$ -Related-Receptor
RXR	: Récepteur de l'acide rétinoïque 9- <i>cis</i> (« Retinoid X Receptor »)
RXRE	: Élément de réponse du récepteur de l'acide rétinoïque 9- <i>cis</i>
SF-1	: Steroidogenic factor 1
SMRT	: Répresseur des RARs et de T3Rs (« Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors »)
TR	: Récepteur de l'hormone thyroïdienne T3
TRE	: Élément de réponse du récepteur de l'hormone thyroïdienne T3
TAF	: Facteur associé à TBP
TBP	: Protéine de liaison de la boîte TATA (TATA-binding protein)
TFII	: Facteur de transcription II
TGF	: Transforming growth factor
TIF	: Facteur intermédiaire de transcription
VDR	: Récepteur de la 1,25-dihydroxyvitamine D3
VDRE	: Élément de réponse à la 1,25-dihydroxyvitamine D3
v-ErbA	: p75 <sup>gag-erbA</sup>

## PRESENTATION DU MEMOIRE

La famille des récepteurs nucléaires est un ensemble de gènes codant des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par un ligand ce qui est le cas au moins pour la moitié des membres de cette famille. Ainsi ces récepteurs sont capables de réguler directement l'expression de gènes cibles en se fixant sur des séquences d'ADN précises situées dans les régions régulatrices de ces gènes. L'intérêt de lier un côté fondamental (comment les cellules eucaryotes régulent-elles l'expression de leur génome) à un aspect plus appliqué (comment relier des pathologies à des altérations des récepteurs nucléaires ou de leur ligands) a conduit de nombreux chercheurs à se pencher sur cette famille. On sait que les récepteurs nucléaires sont codés par une vaste famille de gènes. Cependant, la fonction de la grande majorité des membres de cette superfamille reste un mystère. En effet de nombreux récepteurs sont dits « orphelins » car leur ligand n'a pas encore été identifié, si ligand, il y a.

De nombreux travaux ont été entrepris sur les récepteurs nucléaires, la plupart du temps en disséquant soigneusement l'un d'entre eux. C'est ce que nous avons fait ici en étudiant le profil d'expression, et le mode de fonctionnement de deux récepteurs orphelins, Rev-erb $\beta$  et ERR-1.

Avant de présenter une étude fonctionnelle de ces deux récepteurs orphelins, il nous fallait présenter de manière assez précise ce qui est connu des récepteurs nucléaires classiques ainsi que des possibles mécanismes de régulation de l'activité des récepteurs orphelins: c'est ce que nous avons essayé de faire dans l'introduction de ce mémoire. Si une grande partie de nos travaux concerne des données *in vivo*, nous avons décidé de présenter le côté fonctionnel des récepteurs nucléaires plutôt que leur rôle physiologique, celui-ci nous paraissant trop spécifique de chaque récepteur. Nous avons donc préféré présenter les résultats que les analyses structure/fonction des récepteurs classiques ont permis d'obtenir. Nous avons ainsi pu nous appuyer sur ces données pour émettre des hypothèses sur les mécanismes fonctionnels concernant Rev-erb $\beta$  et ERR-1.

Dans une première partie de l'introduction, après avoir brièvement présenté la superfamille des récepteurs nucléaires, nous avons présenté les éléments de réponse sur

lesquels ils interagissent sur l'ADN. Ceci, nous a alors permis de discuter plus en détail la structure et les rôles des différents domaines qui ont été caractérisés dans les récepteurs nucléaires et d'associer à ces domaines une ou plusieurs fonctions (fixation à l'ADN, dimérisation, fixation du ligand, régulation transcriptionnelle, localisation nucléaire...).

Il devenait alors intéressant de discuter quelques mécanismes de mise en route des récepteurs nucléaires et plus particulièrement leur interaction avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle de base, les co-activateurs et les co-répresseurs. C'est ce que nous avons fait dans la deuxième partie de l'introduction.

Pour la troisième partie, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés aux récepteurs orphelins. La question centrale que posent ses molécules est de savoir comment leur activité peut elle être régulée: plusieurs mécanismes sont envisageables: (i) l'existence de ligands. Nous avons donc présenté les différentes stratégies de recherche de ligands en insistant sur la différence entre « vrais » ligands et molécules activatrices. (ii) la régulation de leur activité par d'autres voies ne nécessitant pas l'existence d'un ligand comme la phosphorylation. (iii) les capacités de certains récepteurs orphelins à réguler l'activité de récepteurs classiques. Finalement, nous avons présenté plus en détail les données concernant les deux récepteurs orphelins étudiés dans ce travail Rev-erb $\beta$  et ERR-1. Dans ce dernier cas, nous avons insisté quelque peu sur les aspects biologiques en décrivant les effets des oestrogènes sur le tissu osseux car ERR-1 est fortement exprimé dans l'os.

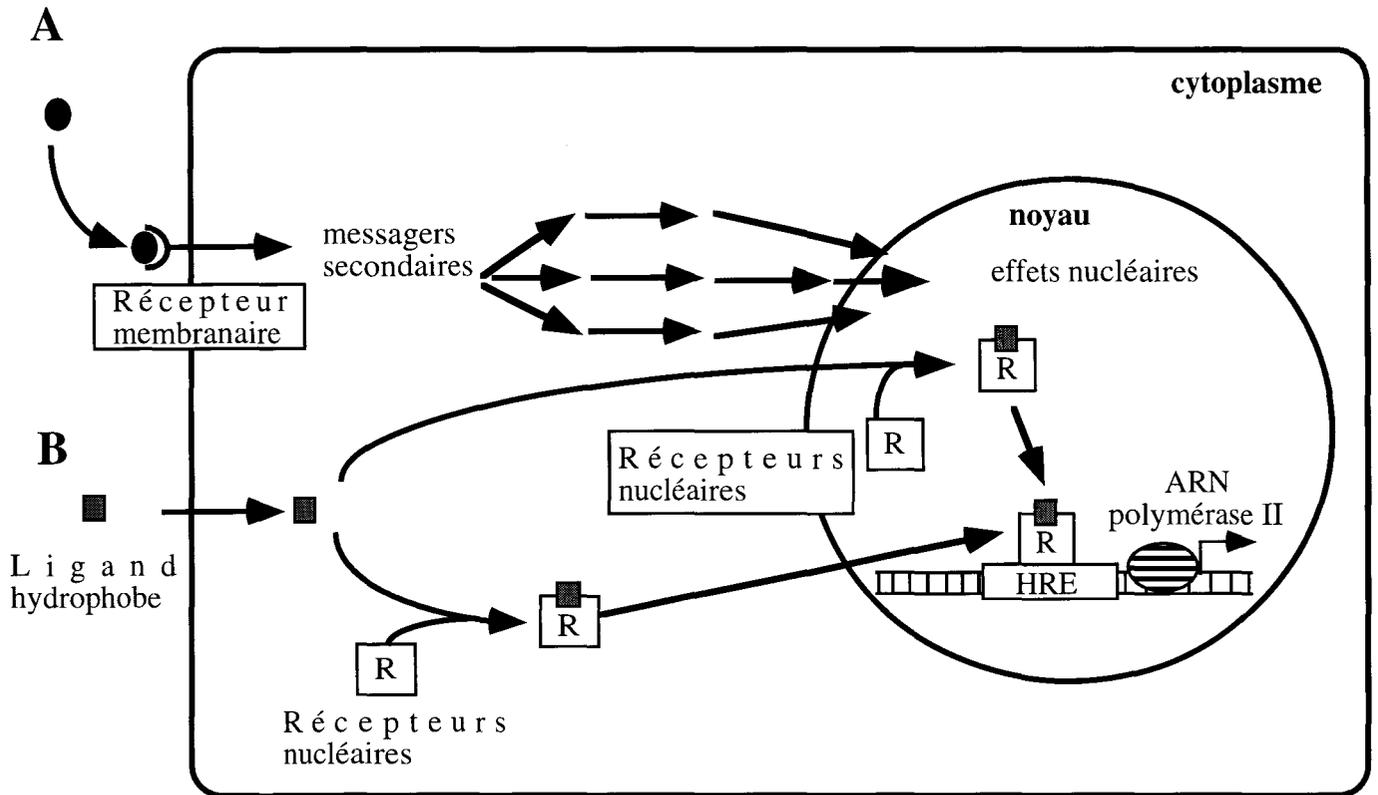
Nous avons choisi de présenter nos résultats sous forme d'articles directement insérés dans la thèse. Chaque article est précédé d'une introduction permettant de replacer dans son contexte les résultats obtenus. Il est suivi d'une discussion afin de mieux mettre en évidence les conclusions auxquelles nous sommes parvenus ainsi que les perspectives qu'elles nous inspirent.

Deux récepteurs orphelins ont été étudiés au cours de ce travail par des voies d'approches assez parallèles. Ainsi dans chaque cas nous avons accompagné une étude détaillée du patron d'expression au cours de l'embryogenèse, d'une caractérisation du mécanisme d'action du récepteur orphelin considéré en termes de fixation à l'ADN ou de régulation de la

transcription. Ces deux approches parfaitement complémentaires trouvent leur meilleure illustration dans le cas du récepteur ERR-1. En effet, nous avons montré que ce gène est exprimé au cours de la formation de l'os lors du développement de l'embryon de souris. En même temps, nous avons caractérisé le produit du gène ERR-1 comme un activateur transcriptionnel agissant *via* un site particulier appelé SFRE.

Une autre caractéristique de notre approche est d'avoir tenté de comprendre la fonction de ces récepteurs orphelins en analysant leurs patrons d'expression dans différentes espèces. C'est le but de notre caractérisation de Rev-erb $\beta$  chez le poisson-zèbre (ainsi que celle de ERR-1 non présentée dans ce mémoire). Le moins que l'on puisse dire est que cette approche a produit des résultats étonnants, très différents de ce que l'on attendait au vue de ce que nous avons mis en évidence chez le poulet ou la souris. Des hypothèses nouvelles importantes pour la compréhension de la fonction biologique peuvent en être tirées, ce qui justifie pleinement cette démarche d'analyse comparée.

## **INTRODUCTION**



**Figure 1:** Les deux grands types de signaux extracellulaires.

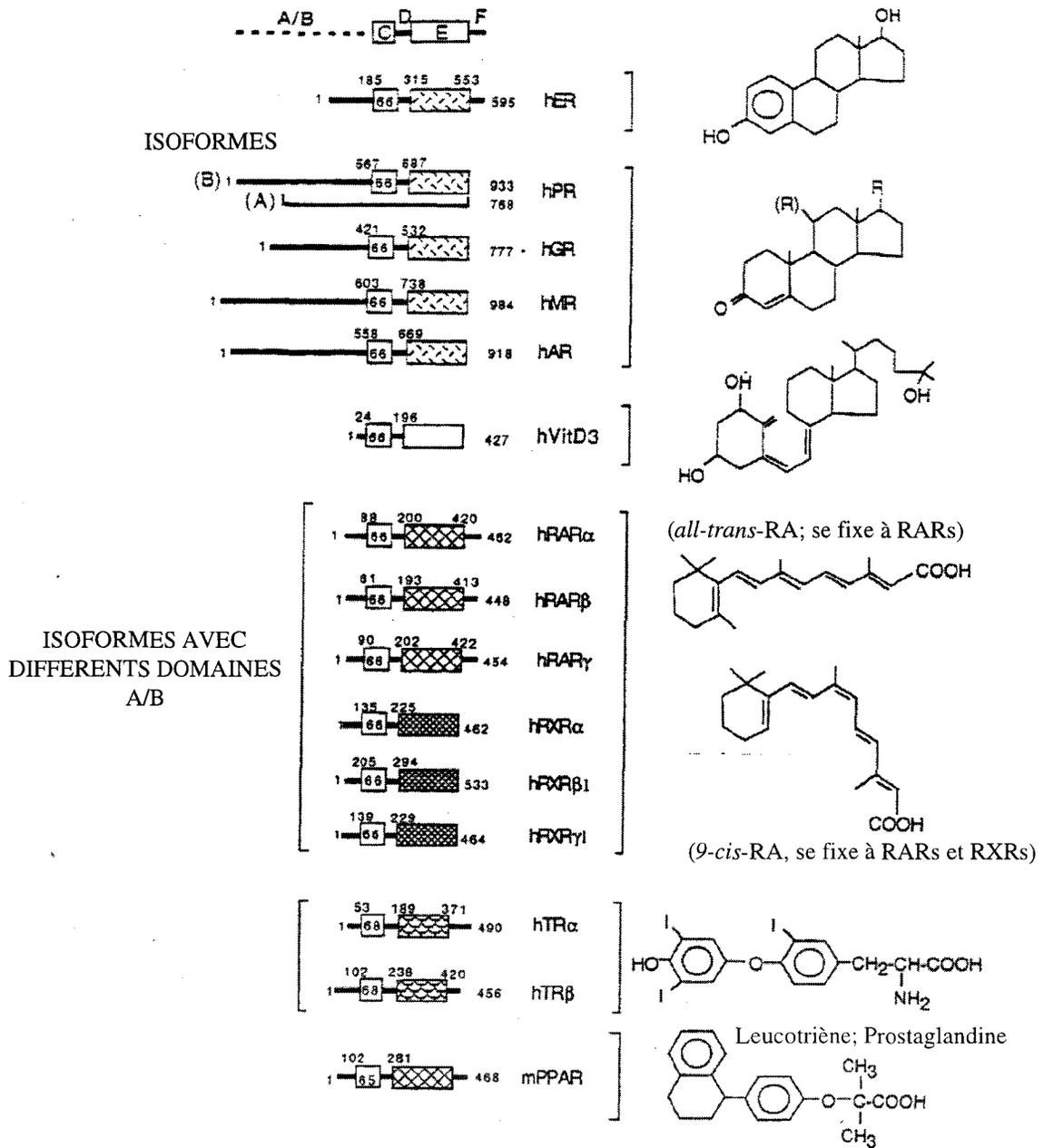
**A:** Un ligand hydrophile se lie à un récepteur membranaire spécifique qui active, du côté cytoplasmique, un ou plusieurs messagers secondaires. Ceux-ci entraînent de multiples effets dans le cytoplasme et dans le noyau par des cascades réactionnelles complexes qui aboutissent à la régulation de gènes.

**B:** Un ligand hydrophobe diffuse à travers la membrane plasmique et reconnaît dans le cytoplasme ou dans le noyau un récepteur spécifique (R) qu'il active. Celui-ci reconnaît une séquence cible ADN de type HRE (pour "Hormone Responsive Element") et contrôle aussi la transcription d'un gène cible spécifique (d'après Braissant, 1994).

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## Communication cellulaire.

Les organismes complexes, comme les mammifères, réagissent aux variations de leur environnement et s'adaptent notamment aux modifications de la température ou des ressources alimentaires, ou encore à celles de leur physiologie, par exemple lors de la gestation. Les différentes parties de ces organismes doivent donc communiquer afin que toutes les cellules soient informées des événements importants. Le fonctionnement de ces systèmes de signalisation intercellulaire repose sur diverses petites molécules comme les hormones et les vitamines véhiculées dans tout l'organisme. Ces molécules interagissent avec des récepteurs spécifiques que l'on peut classer en deux catégories. La première catégorie regroupe des protéines exprimées au niveau de la membrane plasmique qui, par interaction avec leur ligand spécifique (hormones peptidiques par exemple), modulent la concentration intracellulaire de messagers secondaires et entraînent, par des cascades réactionnelles, de multiples effets dans le cytoplasme et finalement dans le noyau (**figure 1A**). La seconde catégorie comprend des récepteurs dits nucléaires reconnus par des hormones lipophiles capables de passer à travers la membrane plasmique. Parmi celles-ci, les plus connues sont les hormones stéroïdes et thyroïdiennes et les dérivés de la vitamine A (acides rétinoïques). Ces hormones interagissent avec leurs récepteurs nucléaires et forment un complexe hormone-récepteur dans le noyau. Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription capables de reconnaître spécifiquement au niveau du promoteur d'un gène des séquences leur permettant de moduler l'expression de ce gène (revue dans Evans, 1988; Parker, 1990; **figure 1B**). C'est à cette deuxième catégorie de récepteurs que nous nous sommes intéressée.



Plusieurs récepteurs nucléaires orphelins possédant une structure en domaines A à F.

**Figure 2:** Illustration de différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. La subdivision en domaines (A-F) des récepteurs nucléaires est illustrée en haut de la figure. Les domaines les plus conservés sont indiqués par deux boîtes, la première représentant le **domaine C** (domaine de fixation à l'ADN) et la deuxième correspondant au **domaine E** (domaine de fixation du ligand et qui intervient également dans la dimérisation des récepteurs nucléaires). Dans cette figure les récepteurs nucléaires orphelins n'ont pas été intégrés mais ils présentent la même structure en domaines (d'après Gronemeyer et Laudet, 1995).

# I La famille des récepteurs nucléaires.

## 1) Définition.

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription ligands-dépendants caractérisés par une structure en domaines dont les plus conservés sont le domaine C, qui intervient dans la fixation des récepteurs à l'ADN, et le domaine E nécessaire à la fixation du ligand. Ceci suggère donc que l'activité des récepteurs implique la présence d'un ligand. Pourtant nous verrons qu'une grande partie de cette famille est constituée de récepteurs dits « orphelins » pour lesquels le ligand n'a pas encore été identifié ou n'existe pas.

## 2) Présentation de la superfamille.

La superfamille des récepteurs nucléaires contient de nombreux récepteurs à des hormones classiques et importantes en santé humaine: citons les stéroïdes sexuels comme les oestrogènes, les androgènes ou la progestérone mais aussi d'autres stéroïdes qui jouent un rôle important dans l'homéostasie comme les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes (**figure 2**). Nous le verrons les récepteurs de ces hormones qui furent les premiers récepteurs nucléaires dont les gènes ont été clonés forment un groupe assez homogène. D'autres molécules proches des stéroïdes sont également reconnues par des récepteurs nucléaires: c'est le cas de l'ecdysone chez les arthropodes et de la vitamine D chez les vertébrés. Il est très probable que d'autres stéroïdes, non encore clairement identifiés seront des ligands de récepteurs orphelins.

Mais la famille des récepteurs nucléaires ne contient pas uniquement des récepteurs à des stéroïdes. En effet, on s'est très rapidement aperçu que de petites molécules hydrophobes pouvaient être un ligand de récepteurs nucléaires. C'est le cas des acides rétinoïques qu'ils soient sous la conformation tout-*trans* (reconnus par le groupe des trois récepteurs RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ou 9-*cis* (reconnus à la fois par les récepteurs RAR et RXR). Comme pour les stéroïdes d'autres rétinoïdes, précurseurs ou dérivés du tout-*trans* et du 9-*cis* sont peut-être des ligands de récepteurs nucléaires (**figure 2**).

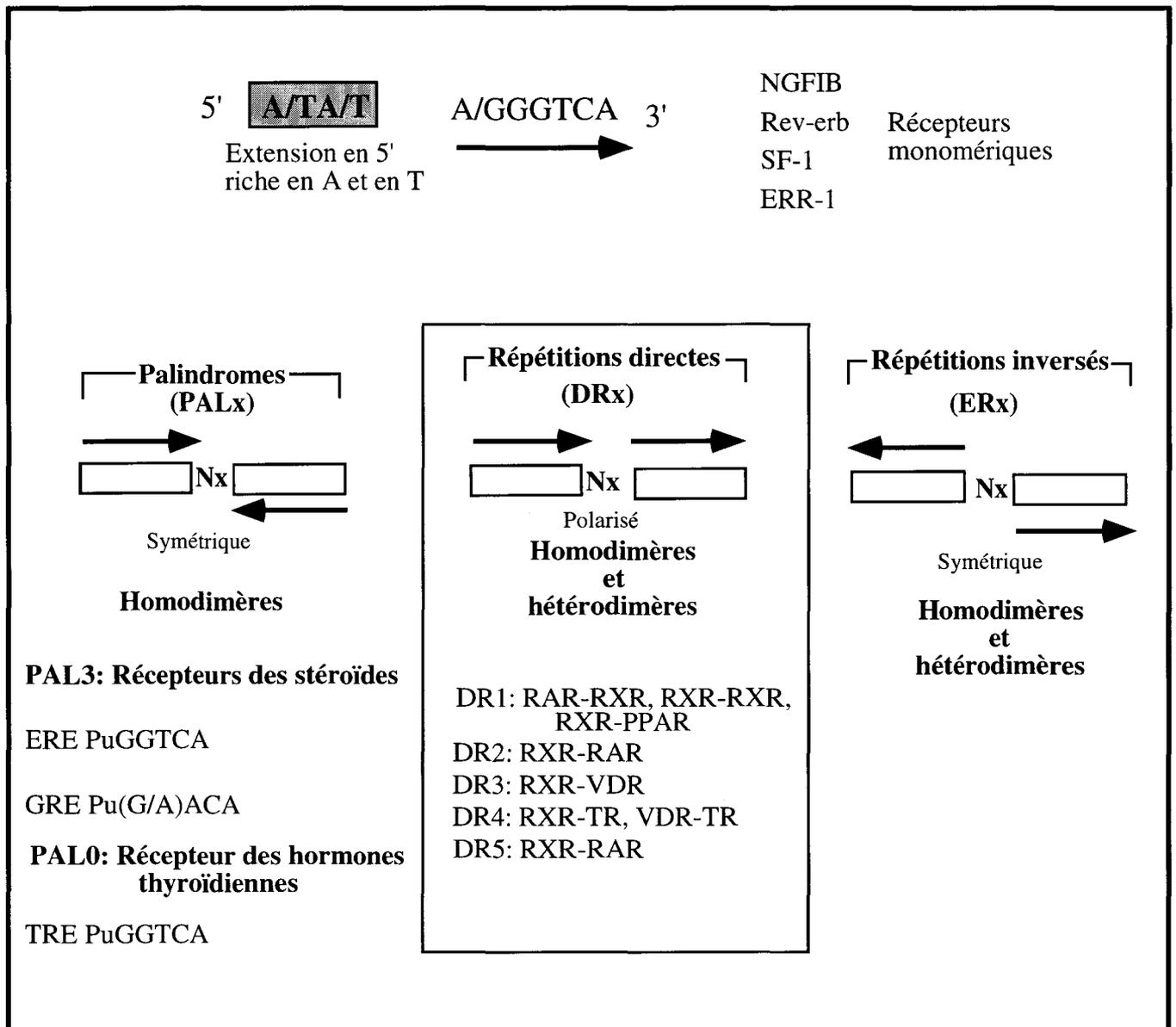
Les hormones thyroïdiennes forment le troisième groupe de ligands « classiques » des récepteurs nucléaires. Elles sont reconnues par deux récepteurs TR $\alpha$  et TR $\beta$  (**figure 2**). Enfin, certaines prostaglandines et certains leucotriènes sont des ligands des récepteurs de type PPAR qui ont originellement été clonés comme des orphelins.

Comme nous l'avons déjà mentionné la superfamille comprend également de très nombreux récepteurs appelés orphelins. Ces récepteurs ne forment pas une classe homogène et sont au contraire extrêmement divers. Citons par exemple, outre les récepteurs Rev-erb et ERR objets de notre travail, les récepteurs de type COUP-TF important pour la différenciation des neurones, les membres du groupe HNF4, exprimés fortement dans le foie ou les récepteurs du groupe NGFIB qui sont tous des gènes inductibles par des facteurs de croissance (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996).

Les récepteurs nucléaires sont connus principalement chez les vertébrés et la drosophile mais peu à peu on les rencontre également chez d'autres groupes zoologiques: échinodermes, divers arthropodes mais surtout chez les nématodes grâce aux données obtenues par le séquençage du génome de *Caenorhabditis elegans*. Notre équipe a d'ailleurs montré que les récepteurs nucléaires sont présents chez beaucoup de métazoaires puisqu'on les trouve chez l'hydre et l'anémone de mer, deux membres des Cnidaires, un des embranchements les plus précoces des métazoaires (Escriva et al, 1997).

### **3) Fixation à l'ADN et dimérisation des récepteurs.**

Les récepteurs nucléaires se fixent à l'ADN par l'intermédiaire d'éléments de réponse aux hormones ou HRE (« Hormone Responsive Element ») dont la séquence est, dans la plupart des cas un dérivé de l'hexamère A/GGGTCA. Néanmoins les récepteurs des stéroïdes GR, MR, AR et PR reconnaissent préférentiellement la séquence AGAACA (Luisi et al, 1991; revue dans Glass, 1994). Par contre, les séquences AGGTCA et AGTTCA sont préférentiellement reconnues par ER, TR, RAR et VDR (Schwabe et al, 1993; Umesono et al, 1991).



**Figure 3:** Les différents éléments de réponse des récepteurs nucléaires. Les répétitions du motif A/GGGTCA sont représentées par des flèches. Certains des récepteurs capables de se fixer sur ces éléments sont indiqués. Nx indique un nombre de nucléotides variables (de 1 à 5 pour les répétitions directes DR1 à DR5) (d'après Gronemeyer et Laudet, 1995).

Cet hexamère est le plus souvent présent sous forme de répétitions organisées de différentes façons (Umesono et al, 1989, 1991; Mader et al, 1993; revues dans Gronemeyer et Moras, 1995, Mangelsdorf et Evans, 1995b). Ainsi on peut trouver des palindromes (deux répétitions tête-bêche; PAL), des répétitions directes (DR) ou des répétitions inversées (ER) (**figure 3**).

### 3.1) Fixation des récepteurs nucléaires sur des répétitions directes.

Parmi les nombreux HRE mis en évidence, ce sont les éléments organisés en répétitions directes qui sont le plus fréquemment rencontrés. Ainsi plusieurs récepteurs tels VDR, TR ou RAR, peuvent hétérodimériser avec RXR sur des répétitions directes espacées de 3, 4, 5 nucléotides respectivement, notés DR3, DR4, DR5 (Umesono et al, 1991; Mader et al, 1993; Rastinejad et al, 1995; Carlberg et al, 1993, revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995a et b). Afin de compléter la liste, il s'avère que PPAR et RAR hétérodimérisent avec RXR sur des éléments de réponse constitués de deux motifs AGGTCA séparés par une ou deux bases et que l'on nomme respectivement DR1 et DR2 (Kliwer et al, 1992, Kurokawa et al, 1994). L'orientation de chaque motif ainsi que l'espacement entre ces motifs semblent donc dicter le type de récepteur capable de se fixer sur un site donné. C'est la loi dite de « 1 à 5 » (Umesono et al, 1991; Mader et al, 1993; revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995b; **figure 3**).

Nous venons de le voir RXR et RAR sont capables de reconnaître et de fixer plusieurs types d'éléments de réponse: DR1, DR2 et DR5 (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995b). Il y a donc une très grande variété d'éléments de réponse à l'acide rétinoïque (appelés RARE). Il en est de même pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes qui peuvent reconnaître un très grand nombre d'éléments de réponse différents: DR3, DR4 et DR5 (Mader et al, 1993; Zechel et al, 1994a et b; Desvergne, 1994). La loi dite de « 1 à 5 » n'est donc pas universelle et doit juste être considérée comme étant statistiquement vraie.

De plus, en fonction du type de répétition directe, on peut observer différents types d'hétérodimères. Ainsi sur un élément DR1, on observe un complexe où RAR reconnaît l'élément AGGTCA situé en 5' tandis que RXR reconnaît l'élément situé en 3'. Par contre sur

un DR5 on observe une polarité inverse: RXR est en 5' et RAR en 3' (Zechel et al, 1994a et b; Predki et al, 1994; Kurokawa et al, 1994).

Ces différents complexes exercent des activités transcriptionnelles différentes. Ainsi en présence d'acide rétinoïque, l'hétérodimère RAR/RXR fixé sur un DR1 n'active pas la transcription, alors que l'hétérodimère RXR/RAR fixé sur un DR5 est un puissant activateur. Nous verrons plus loin que la fixation sur le récepteur RAR de co-répresseur tel que N-CoR, pourrait expliquer ces variations dans l'activité transcriptionnelle des différents complexes (Kurokawa et al, 1994; 1995).

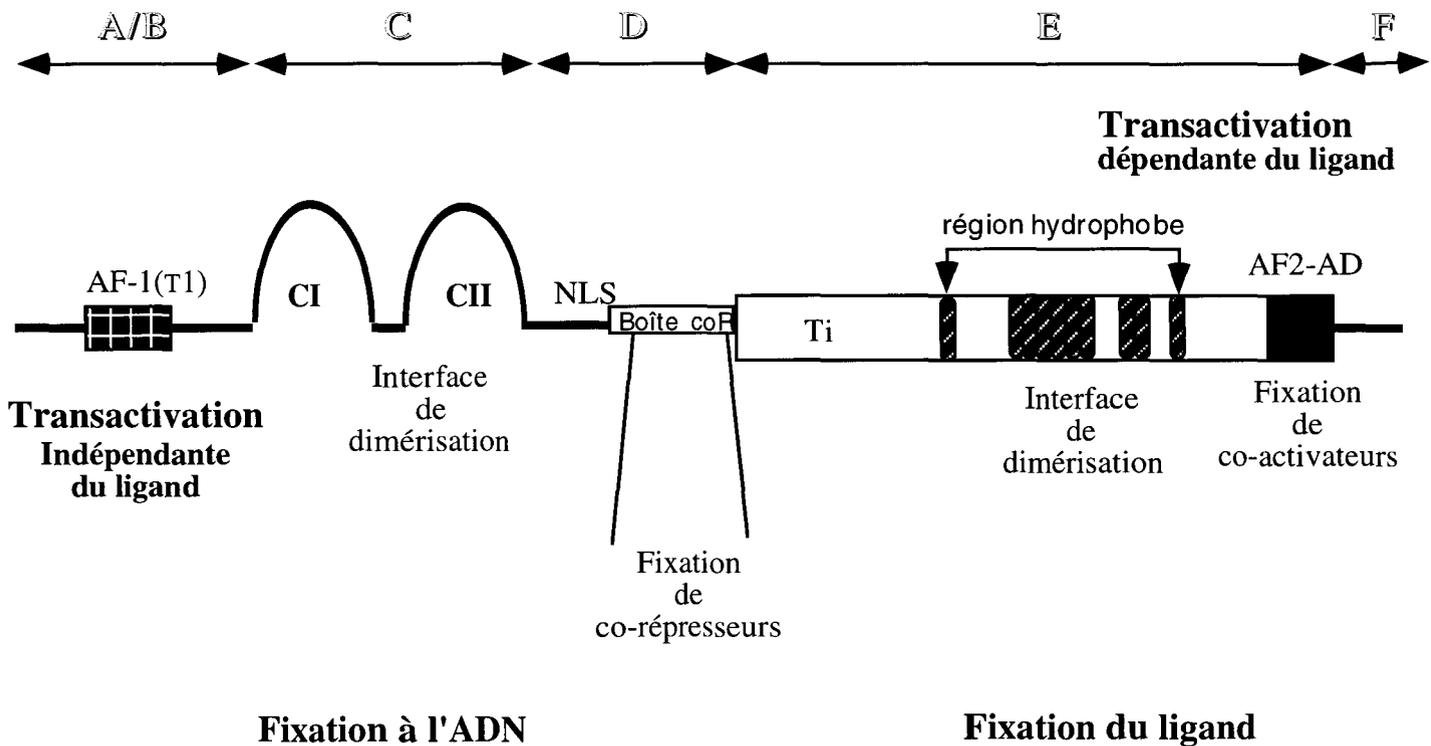
Comme les récepteurs classiques, les récepteurs orphelins peuvent hétérodimériser avec RXR. C'est le cas du récepteur orphelin NGFIB qui forme un hétérodimère avec RXR sur un DR5 (Perlmann et Jansson, 1995).

Enfin il faut préciser que sur les répétitions directes on n'observe pas seulement la fixation d'hétérodimères. En effet, des homodimères peuvent également reconnaître ce type d'élément. C'est le cas de RXR, capable de former un homodimère sur un DR1 ou encore de Rev-erb $\alpha$  qui se fixe sous forme d'homodimère sur un DR2 spécifique car rallongé en 5' d'une séquence riche en bases A et T appelé Rev-DR2 (Zechel et al, 1994a et b; Harding et Lazar, 1995, Adelmant et al, 1996). Rev-erb $\beta$  est d'ailleurs incapable d'hétérodimériser avec RXR (Bonnelye et al, 1994).

### 3.2) Fixation des récepteurs nucléaires sur d'autres éléments.

Les récepteurs nucléaires ne se fixent pas tous sur des répétitions directes. En particulier, les récepteurs des stéroïdes se fixent sous forme d'homodimères sur des éléments palindromiques séparés par trois nucléotides (PAL 3) (Naar et al, 1991; Luisi et al, 1991; Schawbe et al, 1993). Le récepteur des hormones thyroïdiennes TR et celui de l'acide rétinoïque RAR sont eux aussi capables de se fixer sous forme d'homodimères sur un élément palindromique (PAL 0) tandis que TR peut aussi se fixer sur une répétition inversée (ER 3; pour « Everted Repeat ») (Naar et al, 1991; **figure 3**).

Enfin, et pour bien montrer l'extrême diversité et donc la complexité des comportements des récepteurs nucléaires vis à vis de leur fixation à l'ADN, notons que certains



**Figure 4:** Représentation schématique de la structure en domaines des récepteurs nucléaires. Le domaine A/B contient un domaine AF-1 ou T1 qui intervient dans l'activité transactivatrice indépendante du ligand. Le domaine C, domaine le plus conservé, qui est constitué de deux doigts de zinc CI et CII, intervient dans la fixation des récepteurs à leurs éléments de réponse. Il permet aussi la dimérisation sur des éléments de réponse de type palindrome et répétition directe. Le domaine D contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et une région interagissant avec des co-répresseurs ("boîte coR"). Le domaine E, deuxième domaine le plus conservé intervient dans la dimérisation des récepteurs nucléaires ainsi que dans la transactivation dépendant du ligand (domaine Ti et AF2-AD). Il intervient aussi dans la formation de la poche hydrophobe qui sera susceptible d'accueillir le ligand et dans l'interaction des récepteurs avec les co-activateurs.

récepteurs orphelins sont capables de se fixer sous forme de monomères. Ainsi NGFIB reconnaît le site monomérique AAA AGGTCA appelé NBRE (pour « NGFIB Response Element ») alors que SF-1 et ERR-1 vont reconnaître le site TCA AGGTCA appelé SFRE (pour « SF-1 Response Element ») (Wilson et al, 1993; Bonnelye et al, 1997; Johnston et al, 1997; **figure 3**). Les récepteurs Rev-erb et les ROR sont aussi capables de se fixer sous forme de monomère sur le site A/TAA/TNT AGGTCA appelé RevRE (pour « Rev-erb Response Element ») (Harding et Lazar, 1993; Harding et Lazar, 1995; Adelmant et al, 1996; Retnakaran et al, 1994). Tous ces récepteurs qui se fixent sur des demi-sites, c'est-à-dire sur un seul motif AGGTCA ont néanmoins besoin d'une extension en 5' du motif AGGTCA. Cette extension est différente selon le type de récepteurs mais elle est toujours riche en bases A et T.

#### **4) Organisation générale des récepteurs nucléaires.**

En réalisant des alignements des séquences du récepteur des oestrogènes de poulet avec son homologue humain, l'équipe de Pierre Chambon a suggéré que les récepteurs étaient constitués de plusieurs domaines (Krust et al, 1986). Cinq domaines (A à F) d'identité de séquences variables ont donc été proposés (**figure 4**). Deux de ces domaines, le domaine C et E présentent un important degré de conservation de séquences. L'alignement de séquences d'autres récepteurs nucléaires a confirmé cette organisation en plusieurs domaines (Laudet et al, 1992). La validité de la division en domaines, déterminée au départ par l'analyse de séquences a été pleinement confirmée par leur caractérisation fonctionnelle (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995b).

Le domaine A/B, situé au niveau de la région amino-terminale, est peu conservé entre les différents récepteurs. Il a cependant une fonction importante puisqu'il est impliqué dans l'activité transactivatrice de nombreux récepteurs. Il contient donc une région mal définie appelée, AF-1 (pour « Activating Function-1 ») ou T1 qui agit de manière indépendante du ligand (Hollenberg et Evans, 1988; Dahlman-Wright et al, 1994; Tora et al, 1989; Folkers et al, 1993; Hadzic et al, 1995; **figure 4**).

Le domaine C est très conservé et constitue le domaine de fixation à l'ADN. Ce domaine entre directement en contact avec les éléments de réponse. Il est constitué de deux structures dites en doigt de zinc, CI et CII, qui vont intervenir dans la fixation à l'ADN et la formation d'une interface de dimérisation. (voir pour revue Mangelsdorf et al, 1995b; Parker, 1990; **figure 4**).

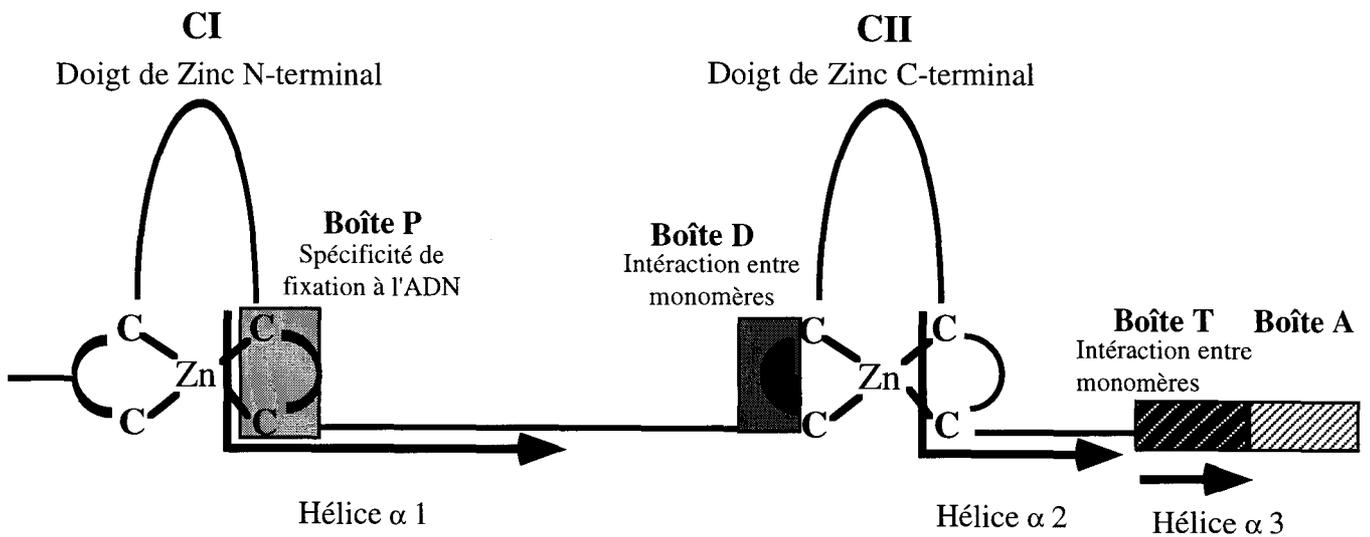
Le domaine D est avec le domaine A/B la région la plus variable en taille et en séquence entre les différents récepteurs. Il intervient dans plusieurs phénomènes distincts dont la répression transcriptionnelle *via* une interaction avec le co-répresseurs N-CoR sur la boîte « coR » (Kurokawa et al, 1995). Il est aussi important pour la localisation nucléaire de nombreux récepteurs et contient une région appelée NLS (pour « Nuclear Localisation Signal ») (Picard et Yamamoto, 1987; **figure 4**).

Le domaine E est le domaine de fixation du ligand. Il intervient également dans la dimérisation et l'activité transcriptionnelle dépendante du ligand des récepteurs *via* le domaine AF2. Ce domaine est en fait constitué de plusieurs hélices alpha qui lui confèrent une structure compacte. Ceci permet de former une poche hydrophobe dans laquelle le ligand est enfermé. (Renaud et al, 1995; Bourguet et al, 1995; Wagner et al, 1995; **figure 4**). Ce domaine contient également une région hydrophobe qui forme une interface de dimérisation. Récemment, de nombreux résultats importants ont mis en évidence l'existence, dans la région carboxy-terminale, d'une région conservée responsable de la régulation positive de la transcription dépendante du ligand (Durand et al, 1994; Baretino et al, 1994; **figure 4**). Cette région appelée AF2-AD (pour « Activating Function 2 Autonomous Domain ») fixe des molécules co-activatrices. Notons, mais nous y reviendrons en détail, que la fixation du ligand entraîne un changement de conformation importante de ce domaine (Wurtz et al, 1996).

Le domaine F n'est pas toujours présent et ne semble pas contenir de fonction particulière. Sa taille est variable et elle peut être très grande, comme dans le cas du récepteur de l'ecdysone de drosophile E75 (670 acides aminés) (Segraves et Hogness, 1990).

Il est maintenant important de présenter en détail ces différents domaines.

A



B

		Boîte P	
GR	419	KLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCRVFFKRAVEGOHNYL	
PR	565	KICLICGDEASGCHYGVLTCGSCRVFFKRAVEGOHNYL	
AR	555	KTCLICGDEASGCHYGALTCGSCRVFFKRAAEGKQKYL	
MR	601	KICLVCGDEASGCHYGVVTCGSCRVFFKRAVEGOHNYL	
ER	183	KYCAVCNEYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSTIOGHNDYM	
RA $\alpha$	56	KPCFVCQDKSSGYHYGVSAECGCKGFFRSTIQKNMYYT	
TR $\beta$	100	ELCVVCGDKATGYHYRCITCEGCKGFFRRTIQKNLHPSYS	
VDR	22	RICGVCGRATGFHFNAMTCEGCKGFFRSMKRKALFT	
RXR	133	HICAICGDRSSGKHYGVYSCGCKGFFKRTVVKDLTYT	
NGFI-B	264	GRCVCGDNASCQHYGVVRTCEGCKGFFKRTVQKSAKYI	
		Boîte D	Boîte T    Boîte A
GR	457	CAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRKCLQAGMNL EARKTKKKIKGIQQTGV	507
PR	603	CAGRNDCIYDKIRRKNCPACRLRKCCQAGMVLGGRKPKFKFNKVRVVRALDA	653
AR	593	CASRNDCTIDKFRKNCPCSLRKCVEAGMTLGARKLKLGNLKLQEEGEA	643
MR	639	CAGRNDCIIDKIRRKNCPACRLQKCLQAGMNLGARKSKKLKGLKGIHEEQP	689
ER	221	CPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGMKGGIRKDRRGGMLKHKRQR	271
RA $\alpha$	94	CHRDKNCIINKVTRNRCQYCRLOKCFEVMGSKESVRNDRNKKKKEVPKEC	144
TR $\beta$	140	CKYEGKVIDKVTNRNQCQECRFKKCIYVGMATDLVLDLDDSKRLAKRRLTEEN	190
VDR	60	CPFNGDCRITKDNRRHCQACRLKRCVDIGMMKEFILTDEEVQRKREMLKR	110
RXR	171	CRDNKDCIIDKRQRNRCQYCRYQKCLAMGMKREAVQEERQRGKDRNENEVE	221
NGFI-B	302	CLANKDCPVDKRRRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRGRRLPSKP	352

**Figure 5:** (A) Le domaine C des récepteurs nucléaires. Les deux atomes de zinc (Zn) sont maintenus par une structure tétraédrique de 4 cysteines (C). Les boîtes P et A importantes pour la fixation à l'ADN et les boîtes D et T intervenant dans la dimérisation sont indiquées. Les hélices  $\alpha$ , présentes dans le domaine C du récepteur RXR, sont indiquées. (B): Séquences en acides aminés du domaine de fixation à l'ADN de plusieurs récepteurs nucléaires. Les cysteines qui sont coordonnées avec un atome de zinc sont indiquées par cercle noir (●). Le cercle blanc (○) indique une cysteine conservée qui n'interagit pas avec un atome de zinc. Les trois résidus de la boîte P qui interviennent dans la spécificité de reconnaissance de la cible ADN sont encadrés, la boîte D qui intervient dans la mise en place d'une interface de dimérisation et les boîtes T et A qui contribuent à une meilleure fixation à l'ADN, sont aussi précisées (d'après Zilliacus et al, 1995).

#### 4.1) Le domaine A/B.

D'un type de récepteur à un autre, ce domaine est extrêmement variable en taille et en séquence. Ainsi chez l'homme, le domaine A/B du récepteur des glucocorticoïdes (GR) contient 420 acides aminés tandis que celui des hormones thyroïdiennes de type  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) n'en possède que 53 (revue dans Gronemeyer et Laudet, 1995).

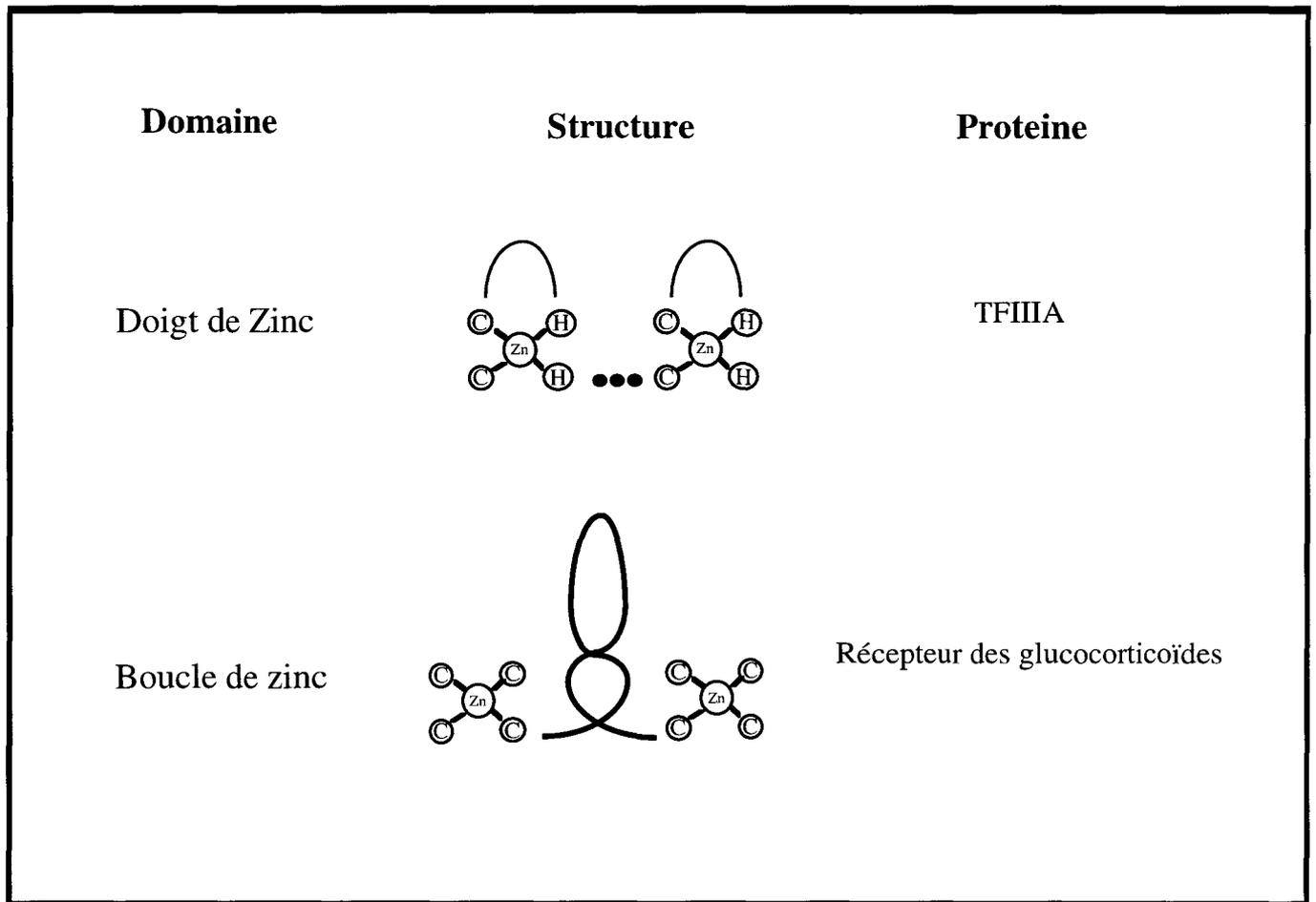
##### 4.1.1) Fonction transactivatrice de la région AF-1.

Malgré l'absence de séquences conservées, une région appelée AF-1 (pour "Activating Function-1") ou T1 a été mise en évidence dans de nombreux récepteurs comme par exemple GR, ER ainsi que RAR et TR (Hollenberg et Evans, 1988; Dahlman-Wright et al, 1994; Tora et al, 1989; Folkers et al, 1993; Hadzic et al, 1995). Elle est responsable de l'activité transactivatrice des récepteurs et agit de manière indépendante du ligand. Par exemple, la fonction transactivatrice du domaine AF-1 de RAR $\beta$ 2 fonctionne de la même manière en présence ou en absence d'acide rétinoïque (Folkers et al, 1993).

Pour illustrer les propriétés activatrices de AF-1, prenons le cas de GR. La délétion de son domaine T1 réduit l'activité de GR à 5% en comparaison avec l'activité totale que présente le récepteur normal en présence de ligand (Hollenberg et Evans, 1988). De plus, la duplication de ce domaine dans le récepteur entier induit une activation de 310%, formant ainsi un « super activateur » (Hollenberg et Evans, 1988). L'étude de la structure de ce domaine par spectroscopie RMN a montré qu'il contenait trois hélices  $\alpha$  dont la mutation diminuait fortement son activité transactivatrice associée à T1 (Dahlman-Wright et al, 1995).

##### 4.1.2) Régulation de la fonction AF-1

La fonction transactivatrice AF-1 peut être modulée par phosphorylation. Ainsi l'inhibition de la phosphorylation de la sérine 118 localisée dans le domaine AF-1 de ER abolit sa capacité transactivatrice (Ali et al, 1993; Bunone et al, 1996). Cette voie d'activation *via* la phosphorylation est utilisée par des facteurs de croissance (EGF, IGF) déclenchant une cascade de kinases capables de phosphoryler ER (Ali et al, 1993; Kato et al, 1995).



**Figure 6:** Caractéristique de la structure du domaine de fixation à l'ADN de deux facteurs de transcription. TFIIA, un facteur à doigt de zinc "classique" et le récepteur des glucocorticoïdes qui comporte une structure différente appelée "Boucle de zinc" ou "zinc twist" (d'après Vallee et al, 1991).

## 4.2) Le domaine C.

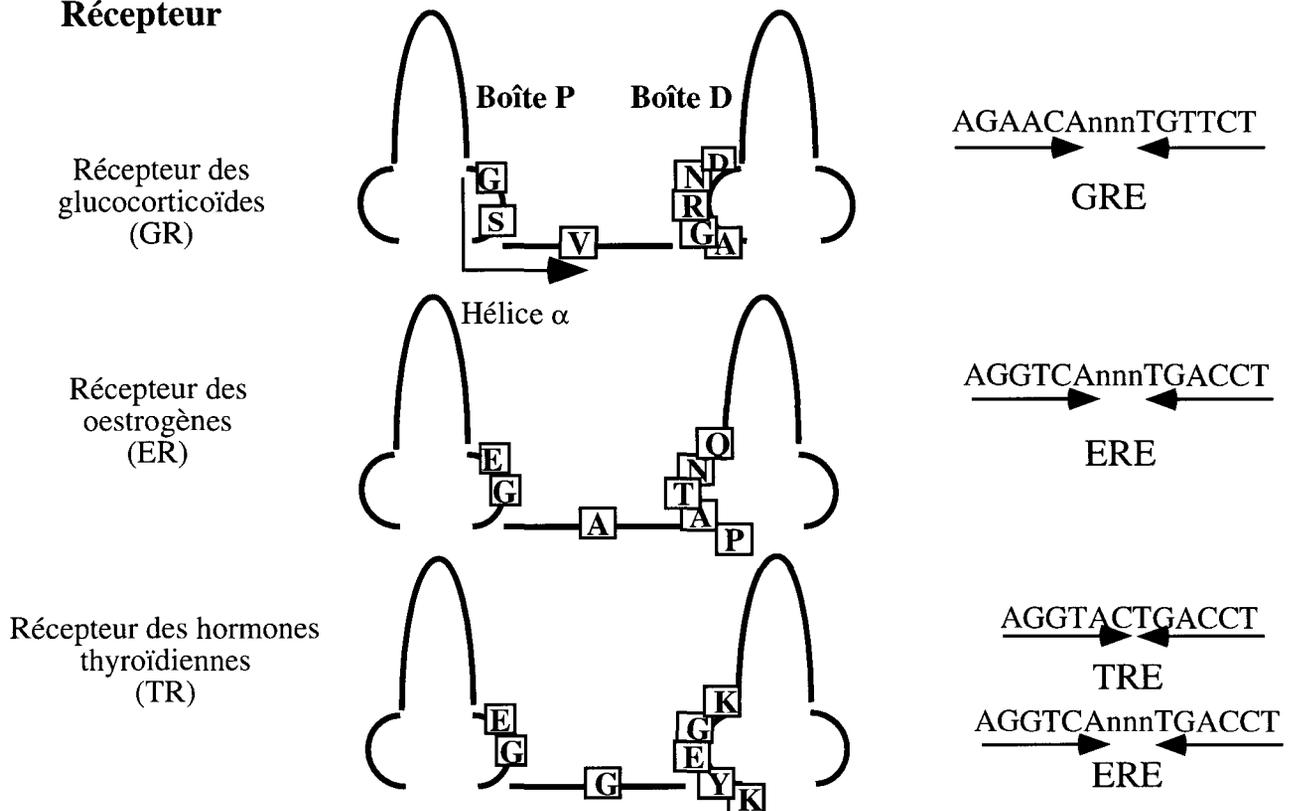
La comparaison des séquences de plusieurs récepteurs nucléaires a permis de mettre en évidence un domaine très conservé appelé domaine C, composé pour la majorité des récepteurs de 68 acides aminés. Ce nombre peut toutefois varier de 67 pour PPAR à 70 pour THR (Laudet et al, 1992). Ce domaine est le plus conservé et correspond au domaine de fixation du récepteur à l'ADN.

### 4.2.1) Structure en doigt de zinc.

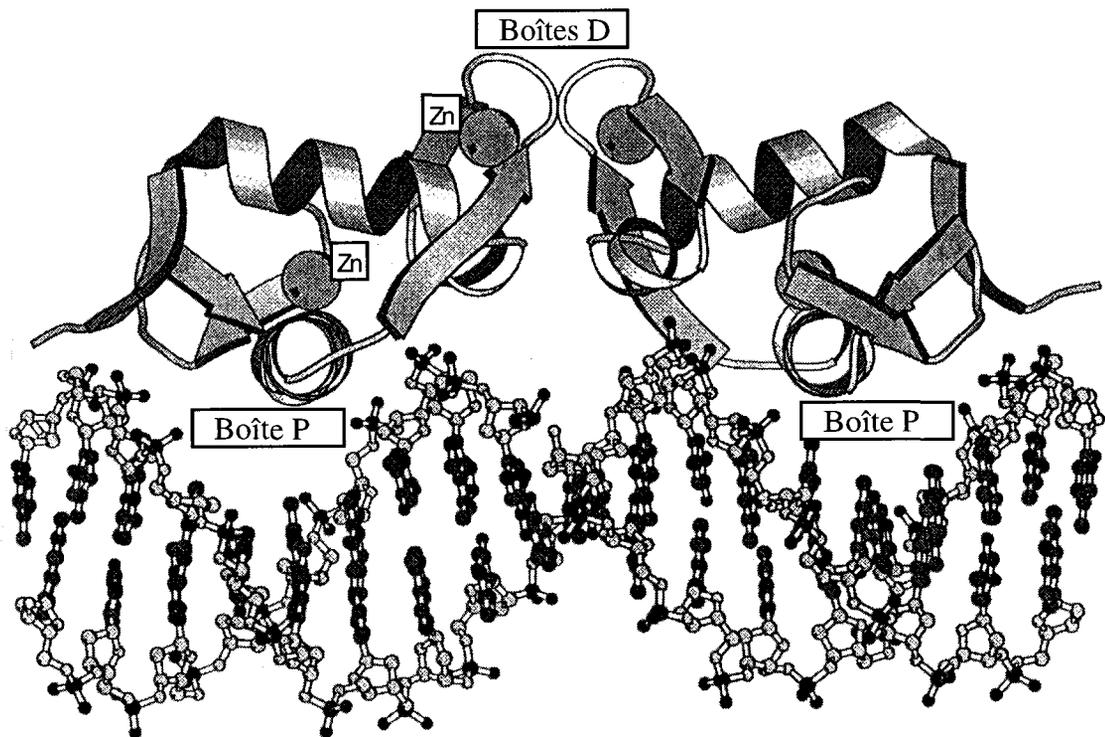
L'analyse des séquences du domaine C des récepteurs nucléaires a montré la présence de cystéines conservées, ce qui a permis de supposer la présence d'une structure en doigts de zinc. Ainsi des études de spectroscopie ont montré que ce domaine contenait effectivement deux atomes de zinc, chacun maintenu dans une structure tétraédrique par 4 cystéines (CI et CII) (Vallee et al, 1991; **figure 5A**). D'autres travaux ont aussi permis de mettre en évidence le caractère essentiel de la présence de ces atomes de zinc dans la fixation du récepteur à sa cible ADN. Ainsi l'utilisation d'agents chélateurs provoquant la libération de ces deux atomes abolit la fixation du récepteur à sa cible ADN (Freedman et al, 1988; Vallee et al, 1991).

La structure tridimensionnelle du domaine C, déterminée par RMN ou par cristallographie aux rayons X, est connue pour de nombreux récepteurs que ce soit en solution ou fixés à l'ADN, seul ou en dimère (ER, GR, RXR, RAR, TR) (revue dans Zilliacus et al, 1995). Cette structure est complètement différente de celle des protéines à doigt de zinc classique comme TFIIIA. Ceci devrait d'ailleurs conduire à l'abandon de l'appellation « doigt de zinc » pour les récepteurs nucléaires, au profit de celle de « boucle à zinc » (« zinc twist ») (Hard et al, 1990; Vallee et al, 1991; **figure 6**). En effet, le domaine C des récepteurs est constitué de deux hélices  $\alpha$  entrecroisées. L'une de ces hélices (H1) fixe l'ADN tandis que l'autre (H2) maintient la rigidité de l'ensemble.

## Récepteur



**Figure 7:** Les boîtes P et D. La boîte P intervient directement dans la reconnaissance de la séquence AGGTCA tandis que la boîte D contrôle l'espacement entre les deux monomères et joue donc un rôle important dans la discrimination entre les éléments de réponse de type TRE ou ERE (d'après Parker, 1990).



**Figure 8:** Structure tridimensionnelle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) fixé à l'ADN sous forme de dimères sur un site ADN (GRE). Les ronds gris représentent les atomes de zinc (Zn). La boîte P interagit directement avec le grand sillon de l'ADN. Certains résidus dans la région amino-terminale du doigt de Zinc CII interviennent dans la formation d'une interface de dimérisation (Boîte D) (d'après Zilliacus et al, 1995).

#### 4.2.2) La boîte P.

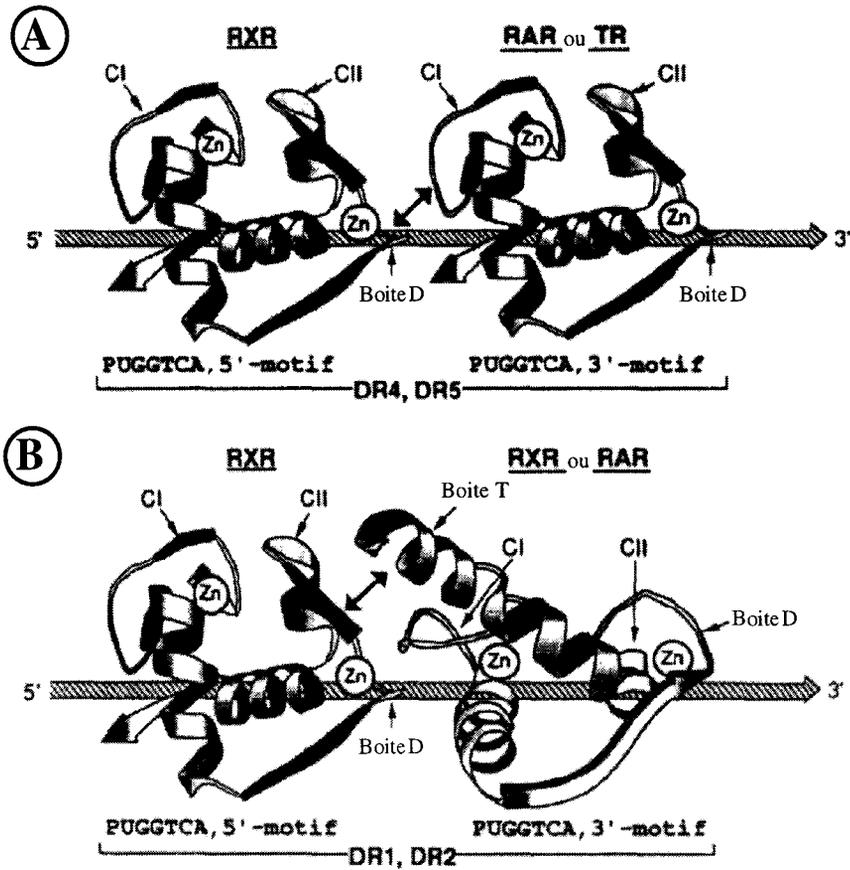
Elle se trouve localisée à l'extrémité carboxy-terminale du premier doigt de zinc CI et est responsable de la spécificité de liaison à l'ADN et de la discrimination des éléments de réponse (**figure 5 A et B**).

La boîte P possède un motif très conservé dont le prototype est la séquence cEGckA présent dans le récepteur des oestrogènes (ER). Les résidus c et ck sont conservés, contrairement aux autres résidus, variables et responsables de la spécificité de liaison à l'ADN de chaque récepteur. TR et ER, qui possèdent une séquence de type cEGckG, vont reconnaître les HREs de type AGGTCA alors que les récepteurs GR, PR, MR et AR (cGSckV) vont préférentiellement reconnaître la séquence AGAACA. Ainsi, si dans ER on change la boîte P pour la transformer en celle de GR (EG et A mutés en GS et V), on obtient un récepteur des oestrogènes incapables de se fixer sur un ERE mais capable de reconnaître un GRE. On a donc ainsi modifié la spécificité de fixation à l'ADN d'un récepteur par la mutation de trois acides aminés critiques (Mader et al, 1989; Danielsen et al, 1989; **figure 7**).

Les structures tridimensionnelles de GR et ER fixés sur leur élément de réponse palindromique sous forme de dimère ont montré que la boîte P fait partie d'une hélice  $\alpha$  (**figure 8**). Elle intervient directement dans l'interaction du récepteur avec sa séquence cible située dans le grand sillon de la molécule d'ADN (Luisi et al, 1991; Schwabe et al, 1993; **figures 7 et 8**). L'étude de la structure tridimensionnelle du domaine C pour l'hétérodimère RXR-TR a également été réalisée et a confirmé que chez ces récepteurs la boîte P interagissait également directement avec l'ADN (Rastinejad et al, 1995).

#### 4.2.3) La boîte D.

La boîte D est située à l'extrémité amino-terminale du second doigt de zinc CII entre les cystéines 5 et 6. Elle possède une séquence spécifique pour chaque récepteur (**figures 5A et B**). Elle contient cinq résidus (sauf pour PPARs (trois résidus) et « taillés » (sept résidus)), nécessaires pour la reconnaissance de l'espacement des motifs « AGGTCA » dans les éléments de réponse (revue dans Gronemeyer et Laudet, 1995). La séquence AGRND, constituant la boîte D de GR, restreint la fixation du récepteur à des éléments de réponse de type



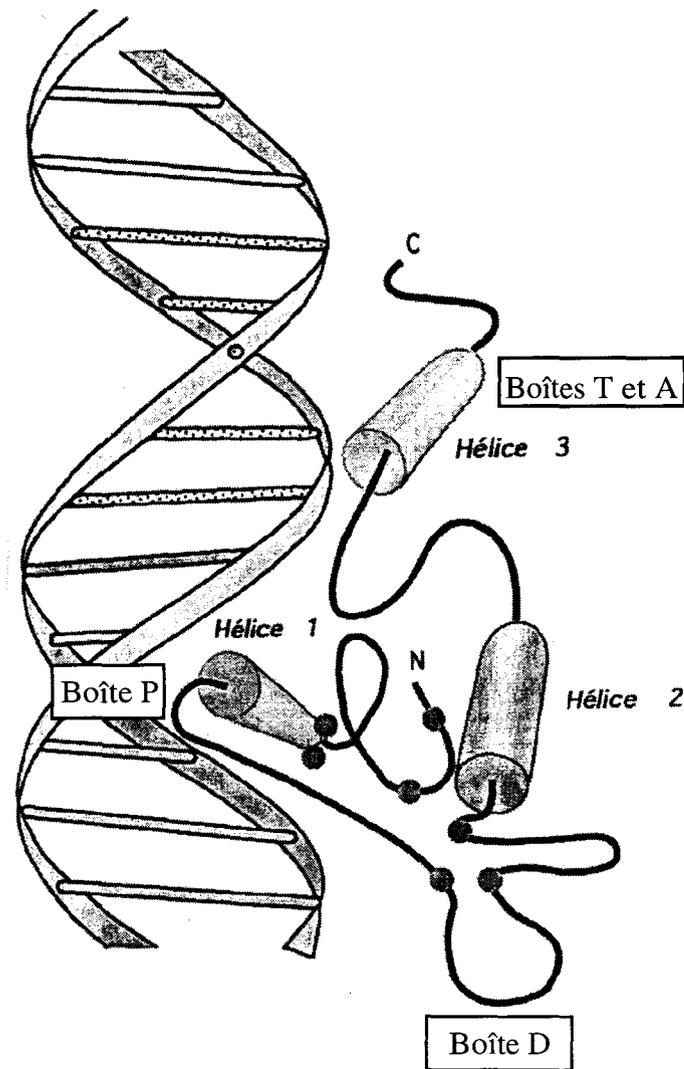
**Figure 9:** En fonction de la nature du partenaire de RXR, les domaines intervenant dans l'interface de dimérisation vont varier. (A) hétérodimère RXR-TR: l'interface de dimérisation sur un site DR4 comprend la boîte D de RXR et le doigt CI de TR. (B) hétérodimère RXR-RAR: l'interface de dimérisation comprend le doigt CII de RXR et la boîte T de RAR. (D'après Zechel *et al*, 1994b)

GRE (PAL3) alors que celle de TR, (à savoir KYEGK), permet la fixation du récepteur sur des sites TRE (PAL0) et de type ERE (PAL3) (**figure 7**). Un mutant de GR contenant les boîtes P et D de TR sera capable de se fixer sur l'élément de réponse TRE (mais aussi sur un ERE). D'autre part, un mutant de GR contenant la boîte P de TR et sa propre boîte D n'est plus capable de reconnaître un TRE, mais uniquement un ERE. Or la seule différence qui sépare un TRE d'un ERE est l'espace qui existe entre les deux demi-sites (Umesono et Evans, 1989). Ceci montre bien que la boîte D contrôle l'espacement entre les deux récepteurs fixés sur l'ADN.

La détermination de la structure tridimensionnelle des domaines C de ER et de GR a permis de montrer que les boîtes D forment une interface de dimérisation (**figure 8**). Les résidus qui interviennent dans cette interface ont pu être identifiés. Ainsi pour GR les résidus 1, 3, et 5 de la boîte D (AGRND) entrent directement en contact avec l'autre monomère pour former une interface de dimérisation (Luisi et al, 1991; **figures 7 et 8**).

La fixation des récepteurs des stéroïdes sur un site palindromique permet la formation d'une interaction symétrique au niveau des boîtes D de chaque monomère (**figure 8**). En revanche, cette interaction est différente pour les récepteurs qui se fixent sur des répétitions directes et elle ne dépend donc plus uniquement de la boîte D. Les hétérodimères RXR-TR et RXR-RAR qui se fixent sur des répétitions directes forment donc une interface de dimérisation asymétrique (**figure 9**). Cette interface va varier en fonction du partenaire de RXR. La boîte D de RXR et le doigt CI de TR sont nécessaires à la formation de l'interface de dimérisation entre RXR et TR sur un DR4 (Zechel et al, 1994a et b; **figure 9A**). En revanche, c'est la boîte T de RAR et le doigt CII de RXR qui interviennent dans la fixation de l'hétérodimère RXR-RAR sur un DR2 (Zechel et al, 1994a et b; **figure 9B**).

Ces résultats, obtenus lors d'expériences de mutagenèse, ont été confirmés par la détermination de la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère RXR-TR fixé sur un élément de réponse de type DR4. En effet dans cette structure, l'interface de dimérisation de RXR est localisée au niveau de la boîte D de RXR tandis que celle de TR est localisée au niveau du doigt de zinc CI et de la boîte T (Rastinejad et al, 1995). Cependant RXR semble posséder plus d'une interface de dimérisation puisque le changement d'un seul nucléotide dans l'espacement entre les répétitions du HRE est responsable de la rotation de 36° du partenaire de RXR autour de la



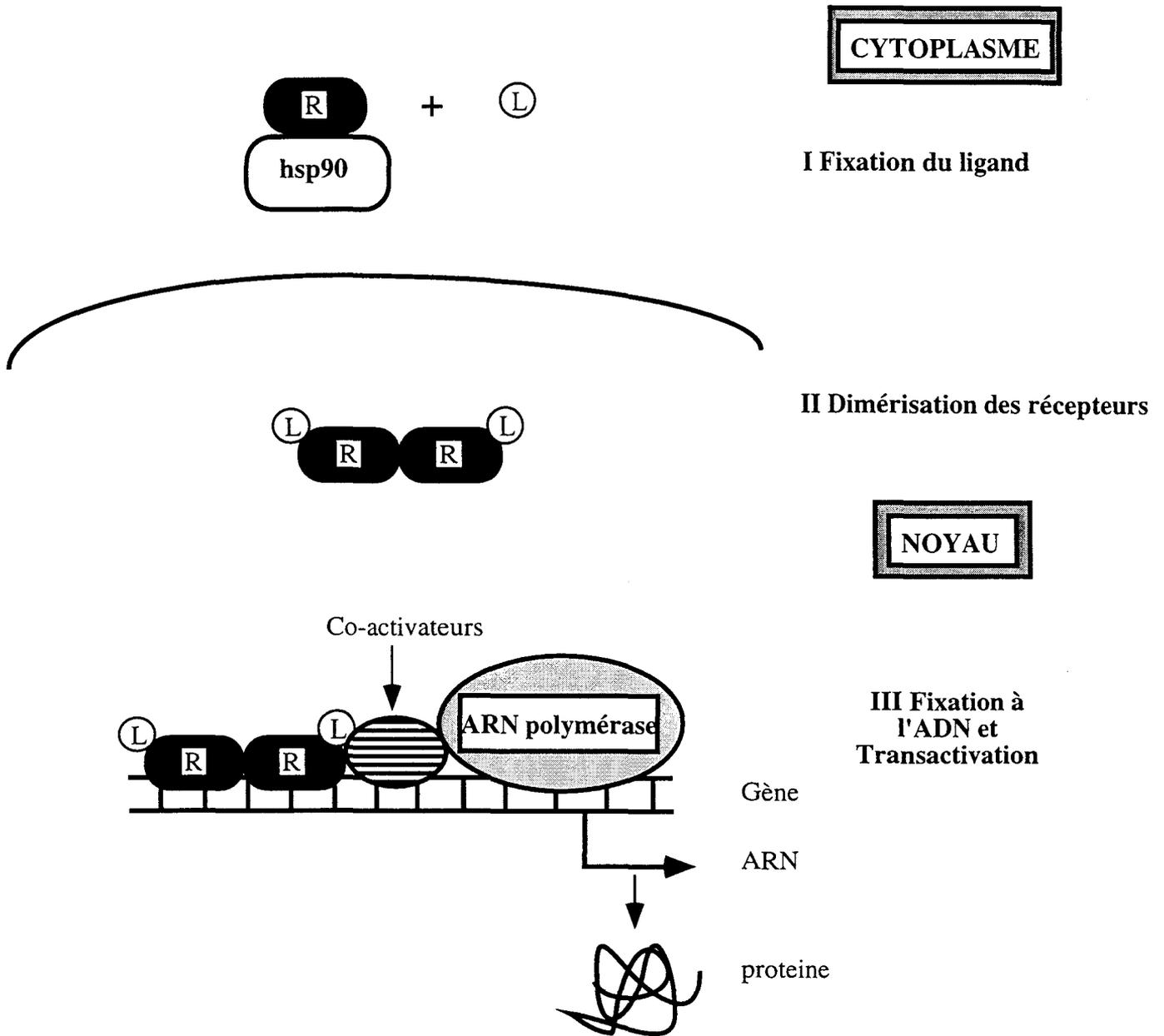
**Figure 10:** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine de fixation à l'ADN de RXR. La boîte P forme une hélice  $\alpha$  qui interagit avec le grand sillon de l'ADN. De plus dans la partie carboxy-terminale du domaine C les boîtes T et A forment une troisième hélice  $\alpha$  qui interagit directement avec le petit sillon de l'ADN et stabilise alors le contact récepteur/ADN (d'après Adelmant et Laudet, 1995).

double hélice d'ADN. On imagine donc mal comment RXR pourrait interagir avec ces différents partenaires *via* la même interface. Le récepteur RXR ne possède donc pas une interface de dimérisation unique mais une série d'interfaces différentes dans le domaine C, ce qui lui permet d'interagir avec différents partenaires sur des éléments de réponse différents (revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995b).

#### 4.2.4) Les boîtes T et A.

Ces deux boîtes se trouvent en fait localisées dans le domaine D si l'on considère l'organisation en domaine établie initialement par les comparaisons de séquences entre les récepteurs (Krust et al, 1986). Elles participent à l'interaction protéines-protéines (boîte T) et à la fixation du récepteur à l'ADN (boîte A) et présentent des séquences conservées (**figures 4, 5A et B**).

La structure tridimensionnelle du domaine C en solution de RXR $\alpha$  a permis de montrer l'existence dans ce domaine, d'une troisième hélice qui n'existe pas pour GR et ER et qui contient les boîtes T et A (Lee et al, 1993; Schwabe et al, 1993; Luisi et al, 1991). La boîte T intervient dans l'interaction entre monomères puisque des mutations dans la boîte T diminuent la capacité de RXR $\alpha$  à former un dimère sur un DR1 et entraîne sa fixation sous forme de monomères (Lee et al, 1993; **figure 10**). La boîte A intervient, elle, dans l'interaction des récepteurs avec les bases de l'extension 5' de l'élément de réponse localisé dans le petit sillon de la molécule d'ADN. Ceci a été montré pour les récepteurs NGF1-B et SF-1 qui peuvent se fixer spécifiquement sous forme de monomères sur leurs sites respectifs (des demi-sites précédés d'une séquence riche en A et T) grâce à des interactions précises entre des acides aminés de leur boîte A et l'extrémité 5' (Wilson et al, 1993; revue dans Laudet et Adelmant, 1995). De plus la délétion de la boîte A des récepteurs orphelins NGF1-B et SF-1 inhibe complètement la fixation de ses récepteurs sur leurs éléments de réponse NBRE et SFRE (Wilson et al, 1992).



**Figure 11:** Représentation schématique des différentes étapes de fixation d'une protéine de choc thermique (hsp90) au récepteur des glucocorticoïdes. La fixation du ligand permet la libération de hsp90, la translocation du récepteur et de son ligand dans le noyau et la dimérisation. Le dimère se fixe alors à l'ADN et induit la transcription du gène cible.

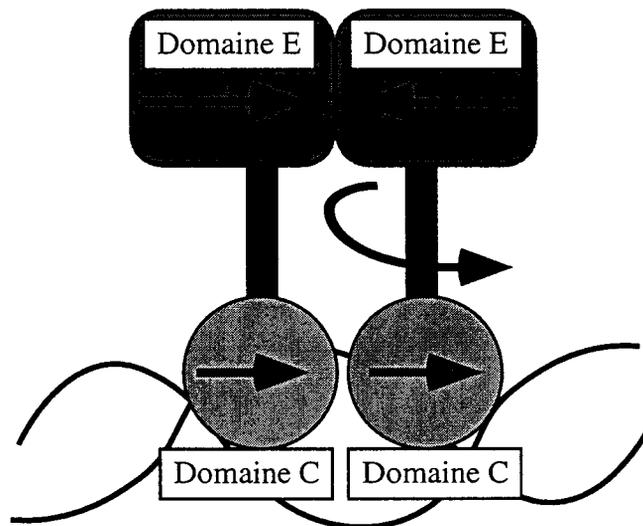
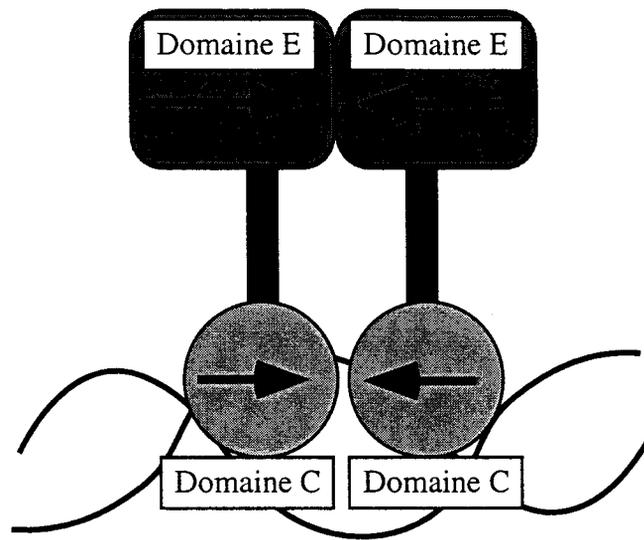
#### 4.2.5) Rôle du ligand dans la fixation à l'ADN.

Certains récepteurs sont capables de s'associer à des protéines, les empêchant alors de se fixer sur leur élément de réponse. Ainsi, en absence de ligand, les récepteurs des stéroïdes sont associés, dans le cytoplasme, à une protéine de choc thermique appelée hsp90 (revues dans Green et Chambon, 1991; Danielsen, 1991; **figure 11**). La protéine hsp90 se fixe à une région située dans le domaine E, nommée Ti (pour « Transcriptional inhibition »), conservée parmi les récepteurs. Cette interaction bloque les récepteurs des stéroïdes dans le cytoplasme les empêchant alors de se fixer sur leur cible ADN (Howard et al, 1990). Malgré la conservation du domaine Ti parmi la majorité des récepteurs, l'interaction avec hsp90 est spécifique des stéroïdes et est abolie par la fixation du ligand. Ceci est un bel exemple de l'intervention indirecte du ligand dans la fixation à l'ADN des récepteurs des stéroïdes. En revanche, ceci ne semble pas être le cas pour d'autres récepteurs nucléaires comme TR et RAR qui sont capables, eux, de se fixer à l'ADN en absence de ligand et qui n'interagissent pas avec hsp90 (Horlein et al, 1995; revues dans Green et Chambon, 1991; Danielsen, 1991). Notons que le récepteur orphelin ERR-2, proche des récepteurs des stéroïdes, fixe également la protéine hsp90. On ignore encore si cette fixation modifie ou non les fonctions de ce récepteur (Pettersson et al, 1996).

#### **4.3) Le domaine D.**

Comme le domaine A/B, le domaine D est extrêmement variable au niveau de la taille et de la séquence. Cette région doit être assez flexible pour permettre une rotation entre le domaine C et le domaine E. Cette flexibilité permet au récepteur de dimériser sur des éléments de réponse (répétitions directes ou palindromes) tout en conservant une interface de dimérisation unique dans le domaine E. Ce domaine autorise donc les changements de conformation nécessaires au récepteur lors de la liaison du ligand, de la dimérisation et de la fixation sur les éléments de réponse (Luisi et Freedman, 1995; **figure 12**).

En fait, l'existence même de ce domaine pourrait être remise en cause. En effet, les boîtes T et A qui font officiellement partie du domaine D doivent fonctionnellement être rattachées au domaine de fixation à l'ADN. De plus, les résultats récents sur la structure



**Figure 12:** Le domaine D doit être flexible pour permettre une rotation dans l'espace entre le domaine C et le domaine E. En fonction du type d'élément de réponse reconnu par les récepteurs (palindromiques ou répétitions directes) les interfaces de dimérisation entre les domaines C de chaque monomère vont varier mais pas celles entre les domaines E d'où la nécessité d'une grande flexibilité du domaine D (D'après Luisi et Freedman, 1995).

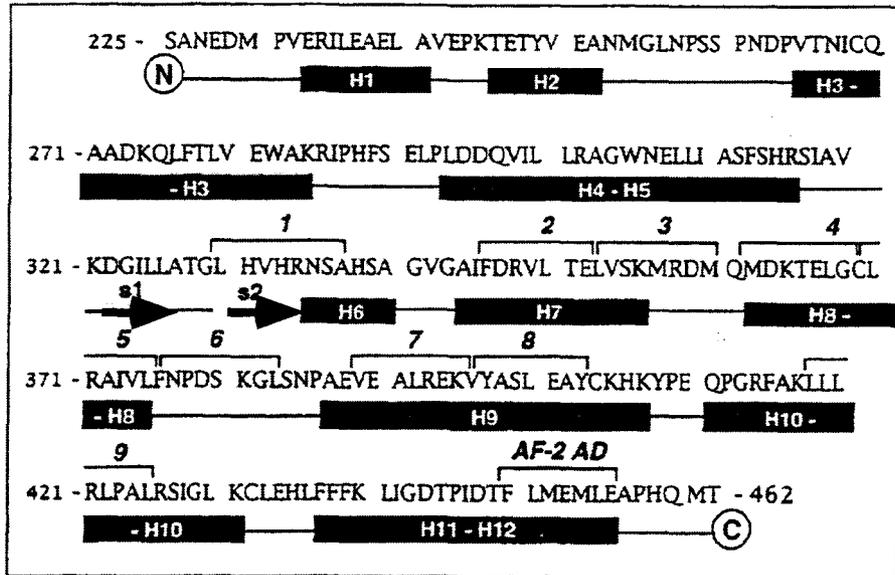
tridimensionnelle du domaine de fixation du ligand de plusieurs récepteurs (RXR, RAR et TR) ne permettent pas de séparer réellement le domaine D du domaine E (Bourguet et al, 1995, Renaud et al, 1995; Wagner et al, 1995). On devrait donc plutôt parler d'une région à faible identité de séquence à l'intérieur du domaine de fixation du ligand. La flexibilité de la région D serait déterminée par un nombre assez faible d'acides aminés localisés en aval du domaine C. Le reste de la région D ferait donc partie intégrante du domaine E et contiendrait les 2 premières hélices  $\alpha$  H1 et H2 de ce domaine.

De plus, il semblerait qu'une partie du domaine D joue même un rôle dans la fixation du ligand. La délétion de certains acides aminés du domaine D de TR $\beta$  inhibe la fixation de la T3 (Lin et al, 1991). La structure tridimensionnelle de TR $\alpha$ 1 montre que cette région correspond à l'hélice H1 conservée parmi RXR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et TR $\beta$  qui intervient dans la formation du complexe hormone/récepteur (Renaud et al, 1995; Wagner et al, 1995). On peut donc facilement imaginer que la délétion totale ou partielle de cette hélice déstabilise la structure du récepteur, et empêche ainsi la fixation de T3.

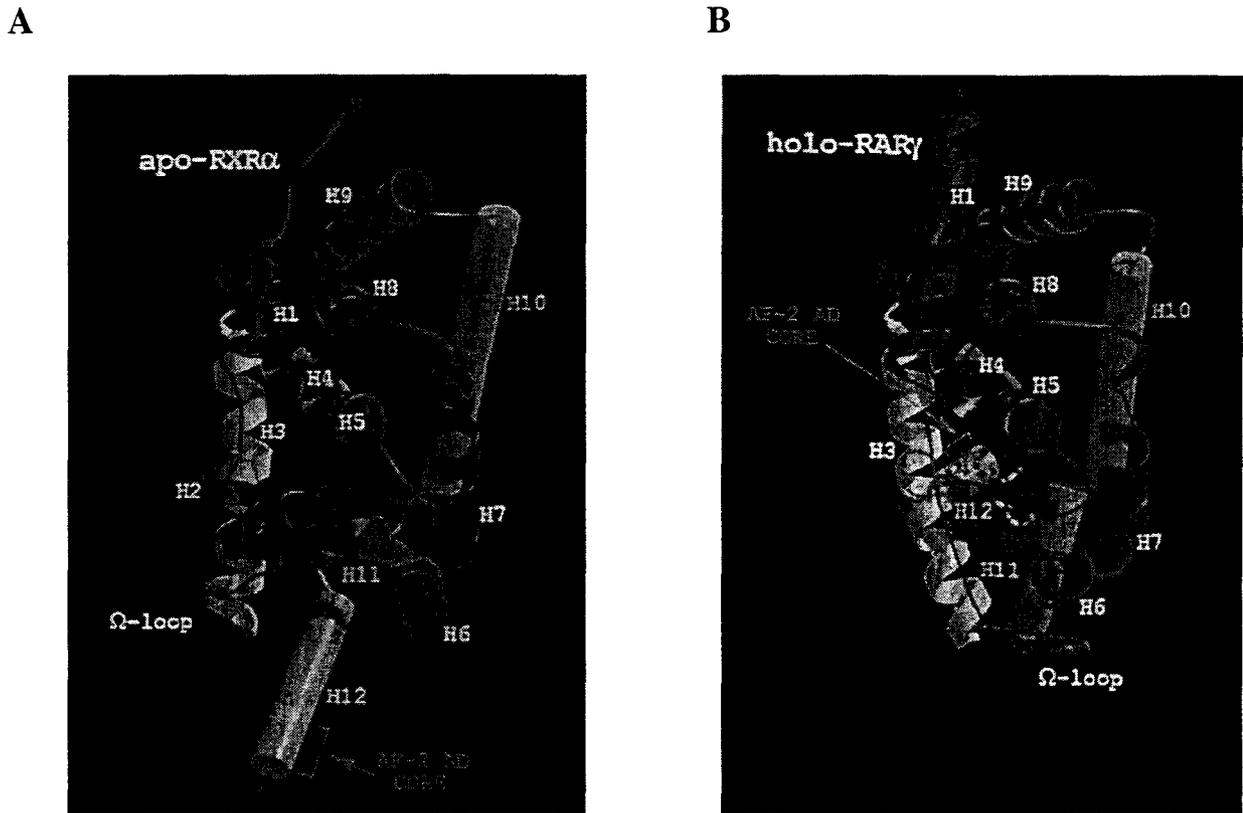
Enfin le domaine D semble aussi être nécessaire à l'activité répressive des récepteurs. En effet il a été montré que H1 était essentielle pour la fixation du co-répresseur N-CoR sur le récepteur des hormones thyroïdiennes. Plus précisément la mutation de trois résidus (AHT) dans l'hélice H1 de TR $\beta$  inhibe la fixation du co-répresseur N-CoR sur TR $\beta$  (Horlein et al, 1995; Wagner et al, 1995; **figure 15A**).

#### **4.4) Le domaine E.**

Le domaine E (ou domaine de fixation au ligand: LBD) est un domaine multifonctionnel d'environ 250 acides aminés en général plutôt hydrophobes. Ceci semble cohérent avec leur rôle dans la fixation du ligand également hydrophobe. En plus de son rôle primordial dans la fixation du ligand, ce domaine E est nécessaire à la dimérisation (homo et/ou hétérodimérisation) et à la transactivation dépendante du ligand (revue dans Gronemeyer et Laudet, 1995). Les domaines E de différents récepteurs présentent une identité de séquence limitée qui peut être inférieure à 35% entre des récepteurs les plus divergents. C'est le cas par exemple de RAR $\gamma$  et de RXR $\alpha$  qui ne présentent que 30% d'homologie entre leur domaine E,



**Figure 13:** Séquence en acides aminés du domaine de fixation du ligand de RXR $\alpha$ . La structure secondaire est indiquée par des boîtes qui correspondent à des hélices  $\alpha$  (H1 à H12) et les feuillets  $\beta$  par des flèches. Les chiffres au dessus de la séquence correspondent à la localisation des 9 "heptades" (de 1 à 9) (d'après Renaud et al, 1995).



**Figure 14:** (A) Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du récepteur de l'acide rétinoïque 9 *cis* humain RXR $\alpha$  sans son ligand (apo-RXR $\alpha$ ). (B) Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du récepteur de l'acide rétinoïque tout-*trans* humain, RAR $\gamma$  en présence de son ligand (holo-RAR $\gamma$ ). Nous pouvons constater le changement de structure engendré par la fixation du ligand et plus particulièrement le repliement de H12 qui vient se placer sous H4 entraînant une inclinaison de la boucle  $\Omega$  qui vient alors se positionner sous H6 entraînant également un changement d'orientation de la boucle séparant H6 et H7 (d'après Renaud et al, 1995).

alors que leur structure tridimensionnelle est très similaire (Wurtz et al, 1996; **figures 14A et B**). Certaines régions comme Ti et AF2-AD sont cependant très conservées et interviennent dans la régulation de la transcription dépendante du ligand. Ce domaine possède également des répétitions de résidus hydrophobes appelé les heptades. Certaines d'entre elles interviennent directement dans l'interface de dimérisation entre les récepteurs (Forman et Samuels, 1990; Laudet et al, 1992).

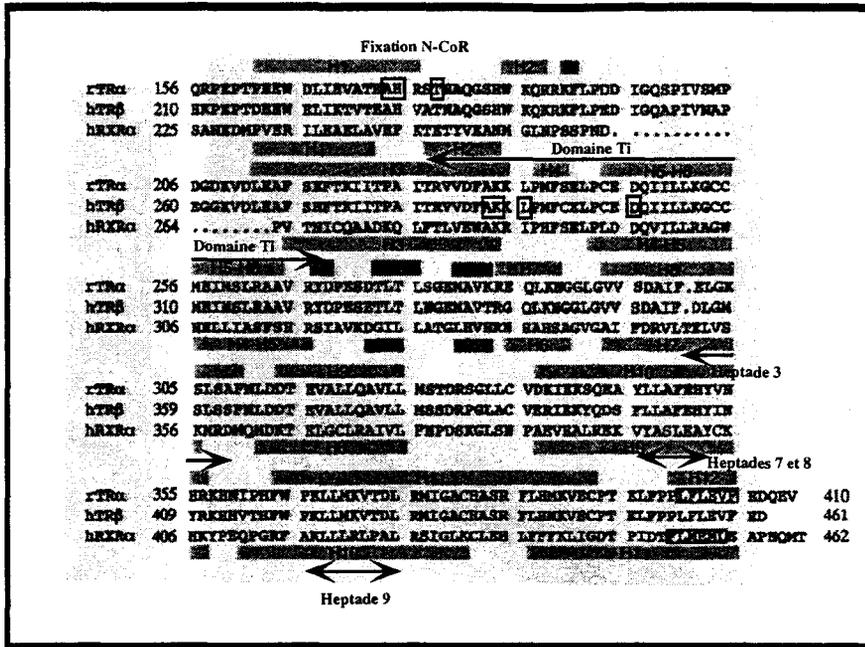
#### 4.4.1) Structure tridimensionnelle du domaine E.

L'analyse cristallographique du domaine E de RXR $\alpha$  non lié à son ligand (apo-RXR $\alpha$ ) et du domaine E de RAR $\gamma$  et TR $\alpha$  en présence de leur ligand (holo-RAR $\gamma$ , holo TR $\alpha$ ) a permis de déterminer la structure de ce domaine (Renaud et al, 1995; Bourguet et al, 1995. Wagner et al, 1995).

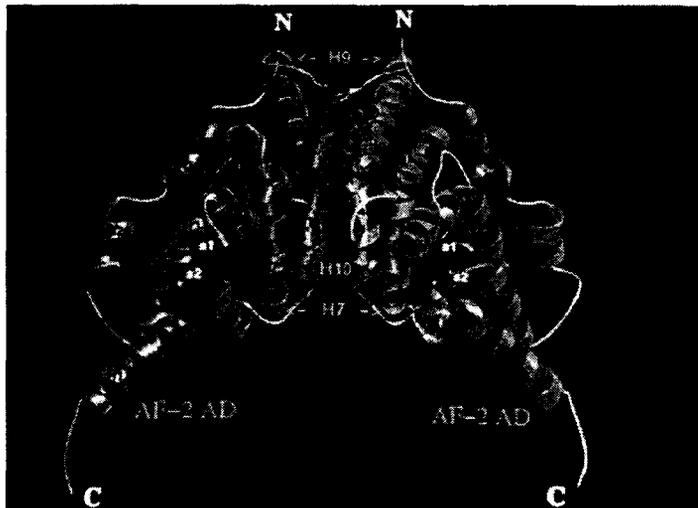
Le domaine E de l'apo-RXR $\alpha$  est constitué de onze hélices  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$  (**figure 13**). L'organisation de ces hélices dans l'espace montre en fait la formation d'un sandwich d'hélices  $\alpha$  (**figures 14A et B**). Les hélices H4, H5, H8, H9 et la partie aminoterminal de l'hélice H11 sont au centre du sandwich tandis que l'on trouve, orientées perpendiculairement, les hélices H1, H2 et H3 d'un côté et les hélices H6, H7 et H10 de l'autre côté. Les deux feuillets  $\beta$ , s1 et s2 sont situés au centre de la structure entre H5 et H6 et forment une épingle à cheveux (Bourguet et al, 1995; **figure 14A**). L'hélice H12 comportant le domaine AF2-AD est dirigée vers l'extérieur. Les régions intervenant alors, dans la fixation de molécules co-activatrices, ne sont pas exposées dans cette structure. Ceci entraînerait donc une incapacité du récepteur à fixer ces molécules co-activatrices et donc son inactivation (Wurtz et al, 1996).

La structure de l'holo-RAR $\gamma$  est très proche de celle de l'apo-RXR $\alpha$  et est constituée de 12 hélices  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$ . On retrouve un grand nombre d'hélices placées de façon identique, notamment dans le coeur hydrophobe de la molécule. En fait, la structure de l'holo-RAR $\gamma$  (ou de l'holo-TR $\alpha$ ) apparaît beaucoup plus compacte que celle de l'apo-RXR $\alpha$  (Renaud et al, 1995; Wagner et al, 1995; **figure 14A et B**). La différence majeure qui apparaît, est la réorientation de la partie carboxy-terminale de la molécule. Ainsi l'hélice H12 ne pointe plus

A



B



**Figure 15:** (A) Comparaison des séquences du domaine de fixation du ligand des récepteurs des hormones thyroïdiennes  $\alpha 1$  de rat et  $\beta$  humain avec celles du récepteur à l'acide rétinoïque RXR $\alpha$  humain. Les structures en hélice  $\alpha$  correspondant à ses séquences sont représentées par des rectangles au dessus des séquences. Le domaine Ti est indiqué par une flèche ainsi que les heptades qui participent à l'interface de dimérisation. La région qui interagit avec le co-répresseur N-CoR est aussi indiquée dans l'hélice H1. (B) Structure tridimensionnelle du domaine E du récepteur de l'acide rétinoïque *9 cis* RXR $\alpha$  humain formant un homodimère en forme "d'ailes de papillon". L'interface entre les deux monomères s'effectue essentiellement au niveau de l'hélice H10 (heptade 9) avec une participation des hélices H9 (heptades 7 et 8) et de la boucle 7 (heptade 3). L'hélice H11 qui contient le domaine de transactivation AF2-AD forme un angle de  $45^\circ$  par rapport à l'axe de symétrie entre les deux monomères (d'après Bourguet et al, 1995).

vers l'extérieur mais au contraire, se replie sur la molécule. Cette nouvelle orientation permet la fixation de co-activateurs sur le domaine AF2-AD et l'induction de l'activité du récepteur (Wurtz et al, 1996).

#### 4.4.2) La dimérisation.

La plupart des récepteurs se fixent à l'ADN sous forme de dimères. Les récepteurs possèdent deux interfaces de dimérisation, une interface faible dans le domaine C responsable de la spécificité de reconnaissance des HREs et une interface forte dans le domaine E qui stabilise le complexe mais ne modifie pas la spécificité de liaison déterminée par le domaine C (revues dans Gronemeyer et Evans, 1995; Mangelsdorf et Evans, 1995b).

Le groupe de Herbert Samuels a émis initialement l'hypothèse de la formation d'une structure en « leucine zipper » *via* une région caractérisée par des répétitions conservées de résidus hydrophobes et que l'on appelle les heptades. Ces heptades sont au nombre de 9 et leur hydrophobicité est susceptible de former une interface de dimérisation (Forman et Samuels, 1990).

L'étude cristallographique de l'apo-RXR $\alpha$  a permis de mettre en évidence l'interface de dimérisation réelle qui en fait, fait intervenir essentiellement les hélices H10 de chacun des monomères. Ceci a pour conséquence la formation d'un axe de symétrie par rapport auquel les hélices H11 (correspond à l'hélice H12 décrite précédemment) forment un angle de 45° (Bourguet et al, 1995; **figure 15B**). Ainsi, si l'on compare la structure déterminée et le rôle des 9 heptades dans la dimérisation décrit par Forman et Samuels, on se rend compte que c'est essentiellement l'heptade 9 présente dans l'hélice H10 qui intervient dans l'interface de dimérisation. Une faible participation dans la dimérisation de l'hélice H9 (heptade 7-8) et de la boucle entre les hélices H7 et H8 (heptade 3) est également observée (**figure 15A et B**). En fait il apparaît clairement que les huit autres heptades participent plutôt à la formation du coeur hydrophobe du récepteur et à la stabilisation de la structure. Leurs mutations affectent la dimérisation car elles entraînent la réorganisation complète de la molécule, ce qui a pour conséquence de casser l'interface de dimérisation.

#### 4.4.3) La fixation du ligand.

Les recherches de sites potentiels de fixation de l'acide rétinoïque 9-*cis* a montré l'existence de deux cavités hydrophobes possibles pouvant renfermer le ligand dans l'apo-RXR $\alpha$  (sites A et B) (Bourguet et al, 1995). La détermination de la structure tridimensionnelle de RAR $\gamma$  a permis d'identifier les hélices intervenant dans la formation de la poche hydrophobe où se fixe l'acide rétinoïque tout-*trans*. La poche hydrophobe de RAR $\gamma$  comprend les hélices H1, H3, H5, les feuillets  $\beta$ , H11 et H12 et correspond au site A décrit pour RXR $\alpha$  (Bourguet et al, 1995; Renaud et al, 1995).

L'alignement des séquences du domaine E de plusieurs récepteurs, suggère qu'une cavité de même type existerait pour un certain nombre de récepteurs comme ceux des stéroïdes (Wurtz et al, 1996). Ainsi la poche hydrophobe de différents récepteurs présenterait une même structure. En revanche la spécificité de liaison des ligands serait due aux résidus variables dans ce domaine. La détermination toute récente de la structure du domaine E du récepteur des oestrogènes en présence d'un agoniste permet de confirmer ce modèle (Brzozowski et al, 1997).

Cette hypothèse semble être également vraie pour les RARs puisque les récepteurs RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont connus pour avoir des affinités différentes pour les rétinoïdes. Chacun des résidus variables au nombre de trois entre RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  va lier plus particulièrement une forme de rétinoïdes. L'alignement de séquences entre RAR $\alpha$  et RAR $\beta$  a permis de montrer, par exemple, qu'un seul résidu variait dans la poche hydrophobe de ces deux récepteurs: résidu sérine pour RAR $\alpha$  et résidu alanine pour RAR $\beta$ . La mutation dans RAR $\alpha$  de la sérine en alanine induit la formation d'un récepteur RAR $\alpha$  capable de fixer des rétinoïdes spécifiques de RAR $\beta$  (Renaud et al, 1995).

De plus les RARs sont connus pour pouvoir fixer l'acide rétinoïque tout-*trans* et 9-*cis* mais avec des affinités différentes. La modélisation du domaine E de RAR $\gamma$  permet d'expliquer la plus faible affinité de RAR pour l'acide rétinoïque 9-*cis*. Les deux formes tout-*trans* et 9-*cis* sont capables de se fixer dans la même poche mais la forme 9-*cis* est plus proche de l'hélice H12. Ceci suggère donc une meilleure interaction entre H12 et la forme 9-*cis*. Ainsi une mutation ponctuelle dans l'hélice H12 inhibe la liaison de l'acide rétinoïque 9-*cis* alors que celle

de l'acide rétinoïque tout-*trans* n'est que peu affectée (Renaud et al, 1995). En conclusion, même si la structure de la poche hydrophobe semble être conservée pour différents récepteurs, la variabilité des résidus dans ce domaine et la forme du ligand peuvent être à l'origine de la spécificité de liaison du ligand. Le même phénomène explique sans doute l'existence de ligands différents pour les différents PPARs (Devchand et al, 1996; Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995).

#### 4.4.4) Changement conformationnel induit par la fixation du ligand.

L'analyse cristallographique du domaine E de l'apo-RXR $\alpha$  et du domaine E de l'holo-RAR $\gamma$  a permis de montrer comment le ligand pouvait agir sur la conformation du récepteur (Renaud et al, 1995; Bourguet et al, 1995. Wagner et al, 1995).

La structure tridimensionnelle du domaine E de RAR $\gamma$  a révélé l'importance de l'hélice H12. En effet, la fixation du ligand induit la réorientation de cette hélice H12.

Ainsi dans l'holo-RAR $\gamma$ , cette hélice ne pointe plus vers l'extérieur comme dans l'apo-RXR $\alpha$  mais au contraire se replie sur la molécule sous l'hélice H4 (Renaud et al, 1995; Bourguet et al, 1995; Wurtz et al, 1996; **figures 14A et B**). Un pont ionique entre H4 et H12 est établi, ce qui est responsable de la stabilisation de H12 contre le domaine E de RAR $\gamma$ . Cette réorientation de H12 affecte également les positions relatives de H10 et H11. Le point de cassure entre H10 et H11 dans l'apo-RXR $\alpha$  devient un simple coude léger dans l'holo-RAR $\gamma$  et l'ensemble H10-H11 devient plus vertical. Ce changement d'orientation entraîne alors une inclinaison de la boucle  $\Omega$  qui vient se loger sous H6. On se retrouve donc face à un domaine E où le ligand est complètement enfermé. L'hélice H12 intervient donc directement dans le changement conformationnel du à la fixation du ligand.

#### 4.4.5) Le domaine AF2-AD et la transactivation.

##### 4.4.5.1) Localisation du domaine AF2-AD.

Le domaine E joue un rôle essentiel dans la transactivation après la fixation du ligand. La recherche de régions intervenant dans l'activité transcriptionnelle des récepteurs, a permis de mettre en évidence l'importance du domaine AF2-AD. Ce domaine est localisé dans la partie

ΦΦ XE ΦΦ

539	P	L	Y	Q	L	L	L	E	M	L	D	A	H	R	L	H	554	mER
535	P	L	Y	Q	L	L	L	E	M	L	D	A	H	R	L	H	550	hER
754	E	F	P	E	M	L	A	E	I	I	T	N	Q	I	P	K	769	mGR
748	E	F	P	E	M	L	A	E	I	I	T	N	Q	I	P	K	763	hGR
904	E	F	P	E	M	M	S	E	V	I	A	A	Q	L	P	K	919	hPR
889	D	F	P	E	M	M	A	E	I	I	S	U	Q	U	P	K	904	hAR
955	E	F	P	A	M	L	U	E	I	I	S	D	Q	L	P	K	970	hMR
413	K	L	T	P	L	V	L	E	V	F	G	N	E	I	S	•	427	hUOR
405	S	M	P	P	L	I	Q	E	M	L	E	N	S	E	G	L	420	hRAR $\alpha$
398	S	M	P	P	L	I	Q	E	M	L	E	N	S	E	G	H	413	hRAR $\beta$
407	P	M	P	P	L	I	R	E	M	L	E	N	P	E	M	F	422	hRAR $\gamma$
446	P	I	D	T	F	L	M	E	M	L	E	A	P	H	Q	M	461	hXR $\alpha$
394	L	F	P	P	L	F	L	E	V	F	E	D	Q	E	U	•	408	hTR $\alpha$
445	L	L	P	P	L	F	L	E	V	F	E	D	•				456	hTR $\beta$
507	P	M	H	K	L	F	L	E	M	L	E	A	M	N	D	•	521	hERR1
420	P	M	H	K	L	F	L	E	M	L	E	A	K	U	•		433	hERR2
430	P	I	D	T	F	L	M	E	M	L	E	A	P	H	Q	L	445	mH-2R11BP

**Figure 16:** Le domaine AF2-AD. La comparaison des séquences de la partie carboxy-terminale du domaine E de plusieurs récepteurs nucléaires permet de révéler la conservation d'un acide glutamique (E) (en position 546 pour ER, ΦΦ XE ΦΦ) ainsi que celle de deux paires de résidus hydrophobes de chaque côté de cet acide glutamique (encadrés): double Leucine LL (543-544) pour les résidus se trouvant en amont de E 546 et Methionine/ Leucine (ML (547-548) pour les résidus se trouvant en aval (encadrés) pour ER (d'après Danielian et al, 1992).

carboxy-terminale du domaine E et conservé chez un grand nombre de récepteurs comme ER, GR, VDR, RAR ou encore RXR (Durand et al, 1994; Barretino et al, 1994; **figure 16**). L'alignement du domaine AF2-AD de nombreux récepteurs nucléaires fait ressortir une séquence peptidique particulièrement conservée dont le consensus est  $\Phi\Phi X E \Phi\Phi$  où  $\Phi$ , correspond à des résidus hydrophobes, E à un résidu acide glutamique conservé et X à un résidu quelconque (Danielian et al, 1992; **figure 16**). Les structures tridimensionnelles des domaines E de TR $\alpha$ 1, RXR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  ont montré que ce domaine AF2-AD était localisé dans l'hélice H12 qui intervient dans la fermeture de la poche hydrophobe (Wagner et al, 1995; Renaud et al, 1995, Bourguet et al, 1995; **figures 15A et B**).

#### 4.4.5.2) Fonction du domaine AF2-AD.

La première identification du domaine d'activation porté par AF2-AD peut-être attribuée à Zenke et collaborateurs en 1990 qui ont étudié les différences d'activité transcriptionnelle entre le récepteur des hormones thyroïdiennes TR et sa version altérée dans son domaine AF2-AD de 9 acides aminés, l'oncogène v-erbA (Zenke et al, 1990). Ainsi ces auteurs ont montré que la perte de la fonction transactivatrice ligand-dépendante de v-erbA résultait de la délétion de ces 9 acides aminés situés dans la partie carboxy-terminale de la molécule.

Plus récemment, de nombreuses expériences de mutagenèse ont permis d'identifier un domaine d'environ 10 acides aminés nécessaire à la fonction transactivatrice dépendante du ligand des récepteurs (Danielian et al, 1992; Barretino et al, 1994; Durand et al, 1994). Ainsi la délétion des dix derniers acides aminés du domaine AF2-AD de RXR $\alpha$  rend inactif ce récepteur (Durand et al, 1994). De plus, la simple mutation de l'acide glutamique conservé dans le domaine AF2-AD ( $\Phi\Phi X E \Phi\Phi$ ) transforme ce récepteur en mutant dominant négatif incapable de transactiver (Barretino et al, 1994; Durand et al, 1994; **figure 16**). L'étude cristallographique de TR $\alpha$ 1 et de RAR $\gamma$  a permis de montrer que cet acide glutamique intervient dans la stabilisation de H12 une fois le ligand fixé mais aussi dans l'interaction du récepteur avec des co-activateurs (Renaud et al, 1995; Wagner et al, 1995).

**PROTEINE SEQUENCES EN ACIDES AMINÉS**

		H3	H4	H5	
rTRβ1	286				305
hVDR	244	<b>FAKMIPGFRDLTSE</b> <b>DQIVLL</b>			263
hRAR	244	<b>FAKRLPGFTGLSIADQITLL</b>			263
Rev-ErbA	347	<b>FAKQIPGFRDLSQHDQVTL</b> <b>L</b>			366
hER	360	<b>WAKRVPGFVDLTLHDQVHLL</b>			379
hGR	577	<b>WAKAIPGFRNLHLDDQMITLL</b>			596

**Figure 17:** Conservation du domaine Ti qui intervient dans l'activité transactivatrice des récepteurs. Des mutations ponctuelles dans ce domaine, comme par exemple des résidus K, L, D localisés dans les hélices H3, H4 et H5 de TRβ1 diminue l'activité transcriptionnelle de ce récepteur (d'après Laudet et al, 1992).

Les résidus hydrophobes ( $\Phi\Phi X E \Phi\Phi$ ) dans le domaine AF2-AD participent à la poche hydrophobe conférant aussi au domaine AF2-AD un rôle dans la liaison du récepteur à son ligand (Renaud et al, 1995; **figure 16**). La réorientation de l'hélice H12 induite par le ligand s'est aussi avérée nécessaire pour la fixation des co-activateurs *via* le domaine AF2-AD. Ainsi la destruction du pont ionique entre H12 et H4 de RAR $\gamma$  par introduction de mutation ponctuelle inhibe l'activité transcriptionnelle de ce récepteur ainsi que la fixation du co-activateur TIF1 *in vitro* (Renaud et al, 1995).

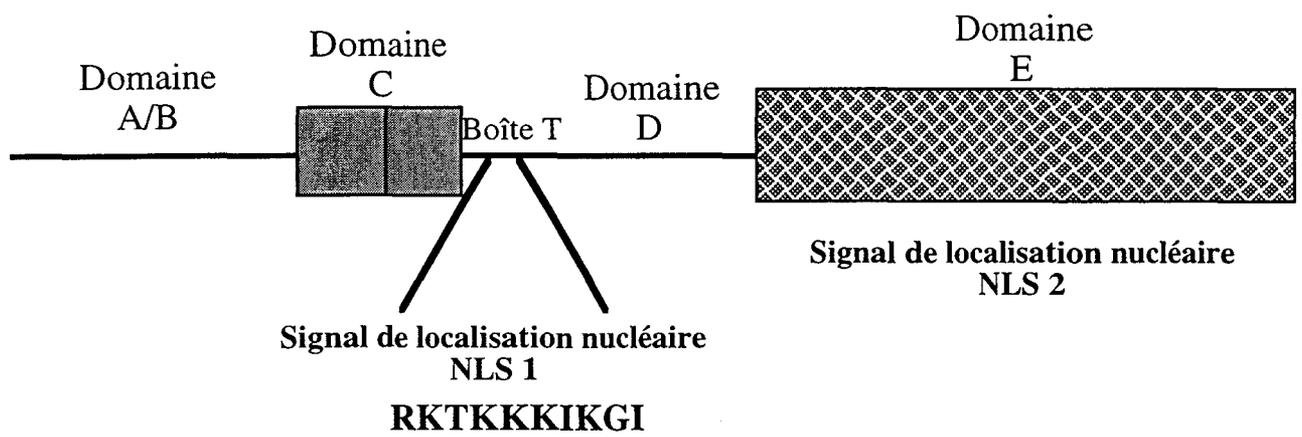
#### 4.4.5.3) Effets de la phosphorylation sur le domaine AF2-AD et la fixation de co-activateurs.

Les récepteurs des oestrogènes possèdent une tyrosine (Y541), dans leur domaine AF2-AD, susceptible d'être phosphorylée et qui maintient le domaine AF2-AD sous forme inactive (**figure 16**). Ainsi la mutation de Y541, dans un acide aminé non phosphorylable, induit la formation d'un récepteur capable de transactiver de manière constitutive c'est-à-dire en absence comme en présence du ligand. On obtient donc un récepteur dont l'activité AF-2 n'est plus dépendante du ligand (White et al, 1997).

De plus ce résidu semble intervenir dans l'interaction de ER avec les co-activateurs RIP-140 et SRC-1 (White et al, 1997). Ces deux co-activateurs interagissent avec le domaine AF2-AD de ER en présence d'oestradiol. En revanche, l'interaction entre le récepteur ER muté dans son résidu Y541 et les co-activateurs RIP-140 et SRC-1, est observée même en absence d'oestradiol. On peut donc imaginer que la phosphorylation de cette tyrosine maintient le domaine AF2-AD sous forme inactive et empêche la fixation de co-activateurs. Une fois déphosphorylée, par un mécanisme qu'il reste à déterminer, ce résidu permet aux co-activateurs de se fixer (White et al, 1997).

#### 4.4.6) Le domaine Ti et la transactivation.

La recherche de régions intervenant dans l'activité transcriptionnelle des récepteurs a permis de mettre en évidence le domaine appelé Ti localisé dans la partie amino-terminale du domaine E (**figure 17**). Des études par mutations ponctuelles dans ce domaine ont été



**Figure 18:** Identification des signaux de localisation nucléaire (NLS) du récepteur des glucocorticoïdes.

réalisées sur le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\beta$ 1. Ces mutants ont engendré dans la plupart des cas un récepteur TR $\beta$ 1 transcriptionnellement inactif en présence de l'hormone T3. En revanche la fixation du ligand, la translocation nucléaire ou encore la fixation de TR $\beta$ 1 sur sa cible ADN ne sont pas affectées. C'est le cas pour les mutations des résidus Lysine (K), Leucine (L) et Asparagine (D) dans le domaine Ti (O'Donnell et Koenig, 1990; **figure 17, voir résidus encadrés**). De manière plus précise la mutation de chaque résidu est responsable d'une perte d'activité transcriptionnelle de TR $\beta$ 1 respectivement de 90%, 60% et 80% par rapport à l'activité normale de TR $\beta$ 1 (O'Donnell et Koenig, 1990). La structure tridimensionnelle de TR $\alpha$ 1 nous montre que ces résidus, qui se situent au niveau de la fin de l'hélice H3, entre H3 et H4, et le début de l'hélice H5, interviennent dans la formation de la poche hydrophobe. Cependant, il apparaît difficile d'associer cette structure avec l'effet produit par les mutations précédemment décrites puisque ces résidus n'interviennent pas directement dans la fixation du ligand à son récepteur (Wagner et al, 1995). On peut cependant supposer que ces mutations déstabilisent la structure de la poche hydrophobe empêchant le ligand de se positionner correctement, ce qui engendrerait un récepteur moins actif.

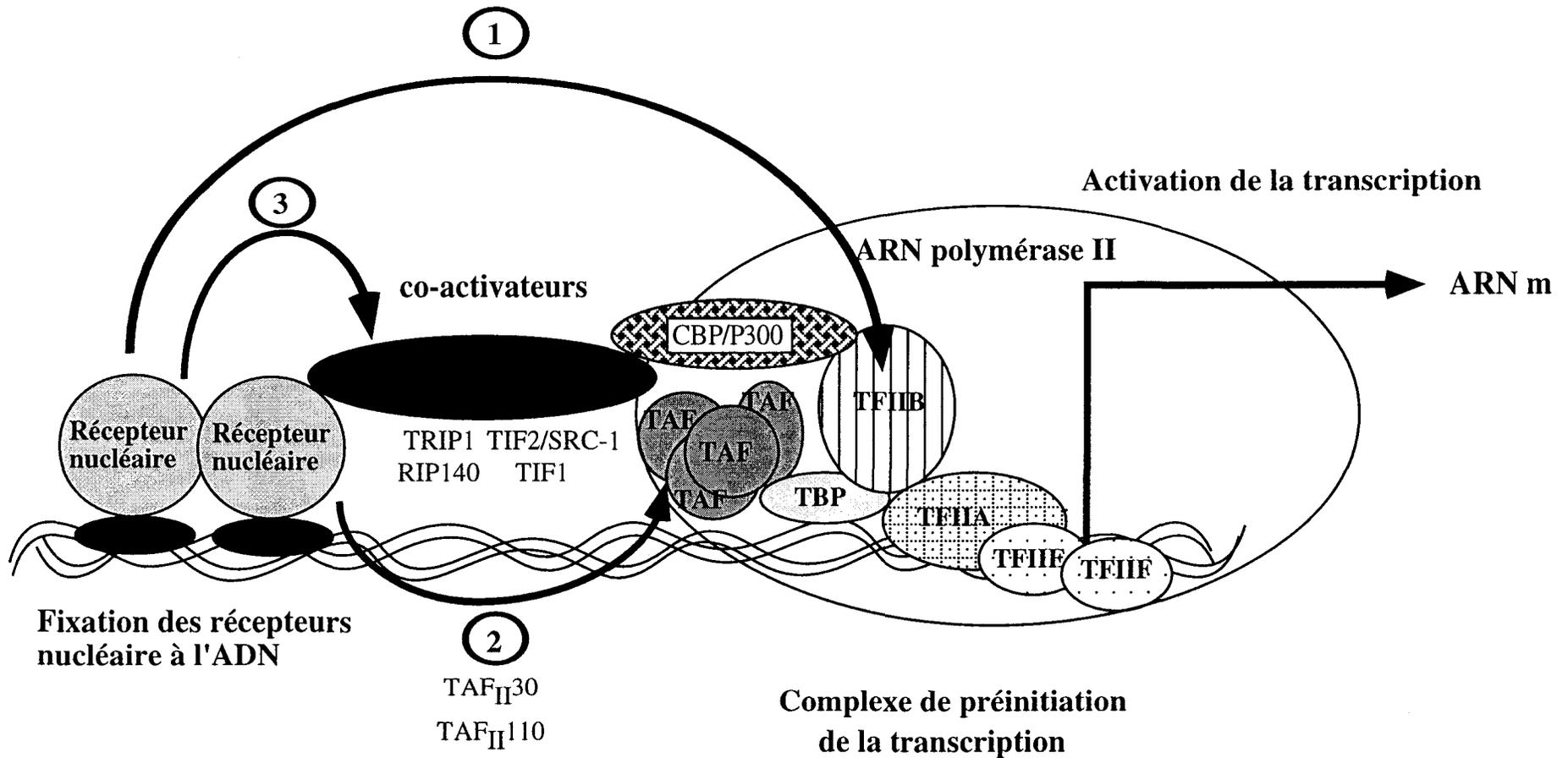
#### **4.5) Le domaine F.**

Le domaine F ne semble pas contenir de fonction particulière et est souvent absent. Sa taille est variable et peut être très grande comme dans le cas du récepteur de l'ecdysone E75 (670 acides aminés) (Segraves et Hogness, 1990).

#### **4.6) Les signaux de translocation nucléaire.**

La localisation nucléaire des récepteurs nucléaires est le résultat d'un transport actif lorsqu'il s'agit du passage du cytoplasme vers le noyau (Guiochon -Mantel, 1994). Il existe des séquences appelées NLS (pour « Nuclear Localisation Signal ») nécessaires pour la reconnaissance des pores nucléaires et la translocation vers le noyau (revue dans Gronemeyer et Laudet, 1995).

Certains auteurs ont pu mettre en évidence deux signaux de translocation nucléaire NLS1 et NLS2 dans les récepteurs des stéroïdes (Picard et Yamamoto, 1987). Le signal NLS1



**Figure 19:** Modèles de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Les récepteurs se fixent à l'ADN sur le promoteur du gène cible *via* leurs éléments de réponse et activent la transcription de celui-ci en provoquant la formation d'un complexe de préinitiation. Ce dernier dépend de l'assemblage de plusieurs facteurs au niveau de la région promotrice. L'activation de la transcription implique la fixation de TFIID, composée de la TBP (protéine de fixation à la boîte TATA) associées à plusieurs facteurs TAF (facteurs associés à la TBP), sur la boîte TATA après avoir inclus dans ce système plusieurs autres facteurs comprenant TFIIA, TFIIB, l'ARN polymérase II, TFIIE, TFIIF. La stimulation de ce complexe multiprotéique par les récepteurs nucléaires semble pouvoir être médiée par des contacts avec TFIIB (**mécanisme N°1**), par des interactions avec des TAFs (**mécanisme N°2**) ou par leur association avec des facteurs de transcription intermédiaires (TIF1, TIF2/SRC-1, RIP140, TRIP par exemple) et CBP/P300 qui pourrait jouer le rôle d'intégrateur entre les co-activateurs et la machinerie transcriptionnelle (**mécanisme N°3**). Le mécanisme de répression par la fixation de co-répresseurs SMRT et N-CoR n'est pas indiqué sur cette figure mais semble se trouver en position intermédiaire entre les récepteurs et la machine transcriptionnelle (d'après Keller et Wahli, 1997).

est situé dans la boîte T pour GR et PR (**figure 18**). Il agit de façon constitutive indépendamment du ligand (Guiochon-Mantel, 1989).

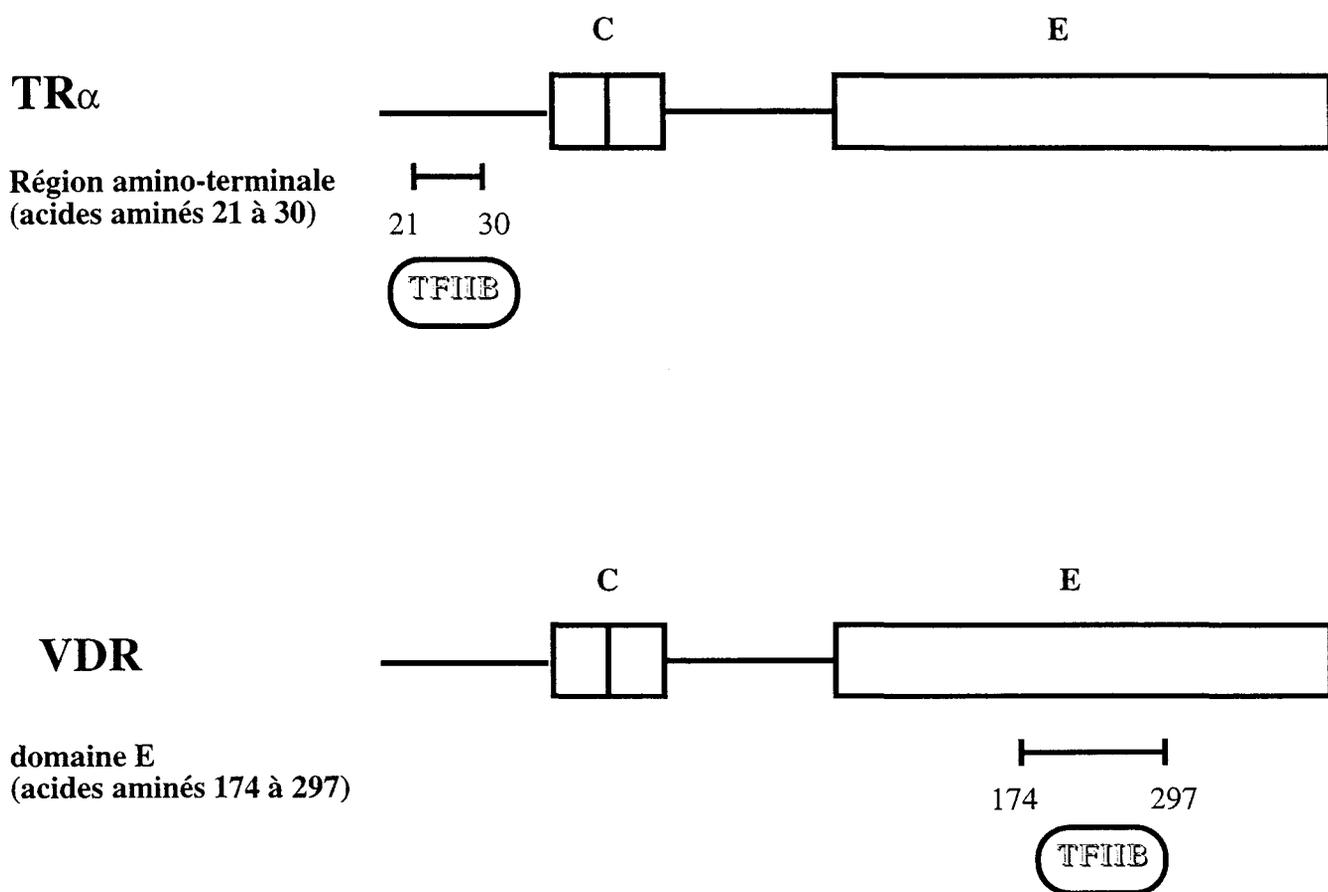
Le signal NLS2 se trouve dans le domaine E mais sa localisation précise n'a pas été déterminée. Son action est dépendante du ligand. De plus, il permet à lui seul la translocation du récepteur dans le noyau (Picard et Yamamoto, 1987). Une des hypothèses sur le mode de fonctionnement de NLS2 serait que ce domaine soit masqué en absence du ligand et que la fixation de celui-ci entraînerait un changement de conformation lui permettant d'agir.

## **II Comment mettre en route un récepteur nucléaire?**

L'étude cristallographique des domaines E de certains récepteurs nucléaires, a permis de montrer que la fixation du ligand entraîne un changement de conformation des récepteurs. Ceci a alors permis d'expliquer comment les récepteurs pouvaient interagir avec des co-activateurs. En revanche ceci ne nous permet pas de comprendre comment la régulation de la transcription s'effectue. Depuis quelques années, des études portant sur les protéines interagissant avec les récepteurs nucléaires et sur leurs rôles dans la modulation de l'initiation de la transcription induite par ces récepteurs, commencent à nous apporter des éléments de réponse dans ce domaine.

### **1) Interaction récepteur nucléaire-facteurs généraux de transcription.**

La transcription des gènes par l'ARN polymérase II nécessite la formation d'un complexe multiprotéique au niveau de la boîte TATA. Ce complexe d'initiation de la transcription comprend la sous-unité TFIID qui est constituée de la TBP (pour « TATA-binding protein »), et de nombreuses TAFs (pour « TBP-Associated-Factors »). Ce complexe comprend aussi les facteurs de transcription TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH. Depuis quelques années, beaucoup d'études se sont portées sur les protéines interagissant avec les récepteurs nucléaires et sur leur rôle dans la modulation de l'initiation de la transcription induite par les récepteurs. C'est de cette manière que les récepteurs nucléaires ont été montrés capables d'interagir, entre autres, avec TFIIB, avec des TAFs comme TAFII30, et avec des co-activateurs et des co-répresseurs.



**Figure 20** : Représentation schématique des zones d'interaction au niveau des récepteurs TR $\alpha$ , VDR avec TFIIB (D'après Blanco et al, 1995; Hadzic et al, 1995).

### 1.1) TFIIB.

L'interaction avec TFIIB a été montrée pour plusieurs récepteurs nucléaires comme COUP-TF, ER, PR, RAR et VDR (revue dans Horwitz et al, 1996; **figure 19, mécanisme N°1**). Cette liaison provoque des changements de conformation de TFIIB qui présente alors de nouveaux sites de liaison avec les autres protéines du complexe d'initiation de la transcription. Le complexe est alors stabilisé ce qui favorise l'initiation de la transcription. Les sites d'interaction avec TFIIB diffèrent d'un récepteur à l'autre par exemple PR s'associe à TFIIB *via* le domaine AF-1 alors que c'est AF-2 qui joue ce rôle pour ER (revue dans Horwitz et al, 1996; Blanco et al, 1995).

L'équipe de Herbert Samuels a mis en évidence une séquence de 10 acides aminés dans le domaine A/B de TR $\alpha$  de poulet qui interagit avec TFIIB. La délétion de ces 10 acides aminés diminue l'activité transcriptionnelle dépendante de l'hormone de 10 à 20 fois (**figure 20**). Dans ce cas, la fixation avec TFIIB est liée avec la capacité de TR $\alpha$  à transactiver (Hadzic et al, 1995). Le récepteur de la vitamine D (VDR), est aussi capable d'interagir avec TFIIB mais au niveau de son domaine E (**figure 20**). Blanco et collaborateurs en 1995 ont montré que la co-transfection de TFIIB et de VDR dans des cellules pluripotentes de carcinome embryonnaire P19 induisait une réponse transcriptionnelle d'un facteur 36, sur un vecteur rapporteur contenant l'élément de réponse VDRE (pour « VDR Responsive Element »), en présence de la vitamine D (Blanco et al, 1995). Cette activation nécessite TFIIB et VDR puisque des transfections séparées de ces deux facteurs conduisent à un taux d'activation qui n'est plus que d'un facteur 2. Cependant cette activation médiée par TFIIB sur VDR ne semble pas être une règle générale dans toutes les cellules. En effet, dans les cellules NIH3T3, TFIIB diminue la capacité d'activation de VDR en présence de ligand. Dans ces cellules, TFIIB provoquerait le la capture ou « squelching » d'un facteur nécessaire à l'activation de la transcription *via* VDR (Blanco et al, 1995). En conclusion, le mécanisme précis par lequel VDR et TFIIB active la transcription reste à déterminer mais semble faire intervenir d'autres facteurs qui sont spécifiques de certaines cellules (Blanco et al, 1995).

<b>Facteur</b>	<b>Interaction avec les récepteurs</b>	<b>Effet du ligand</b>
<b>co-activateurs</b>		
hbrm	GR	Association
ERAP140	hERAF2	Association
GRIP1	GR, AR, ER	Association
p160	CBP et ER	Association
p300/CBP	T3R, RAR, RXR	Association
RAP46	AR, ER, PR, GR	dépend du récepteur
RIP 110	TR, RAR, RXR	dépend du RIP et du récepteur
RIP140	ER	Association
hSNF2a	ER, RAR	?
SRC1	ER, GR, PR, RXR, TR	Association
TRIP	RXR, TR	Différent selon les TRIP
TIF1	ER, TR, VDR, RAR, RXR	Association
TIF2	AR, ER, GR, PR, RAR, RXR, TR	Association
<b>Co-répresseurs</b>		
N-coR	RAR, TR	Dissociation
SMRT	TR, RAR, RXR	Dissociation

**Figure 21:** Les différents co-régulateurs des récepteurs nucléaires (d'après Gelman et al, 1997). Tableau récapitulatif des co-régulateurs connus, qui interagissent avec les récepteurs nucléaires. L'association des récepteurs avec leurs ligands est nécessaire pour l'interaction avec des molécules co-activatrices. Inversement, l'absence du ligand est indispensable pour l'interaction des récepteurs avec les co-répresseurs.

## 1.2) TAFII30.

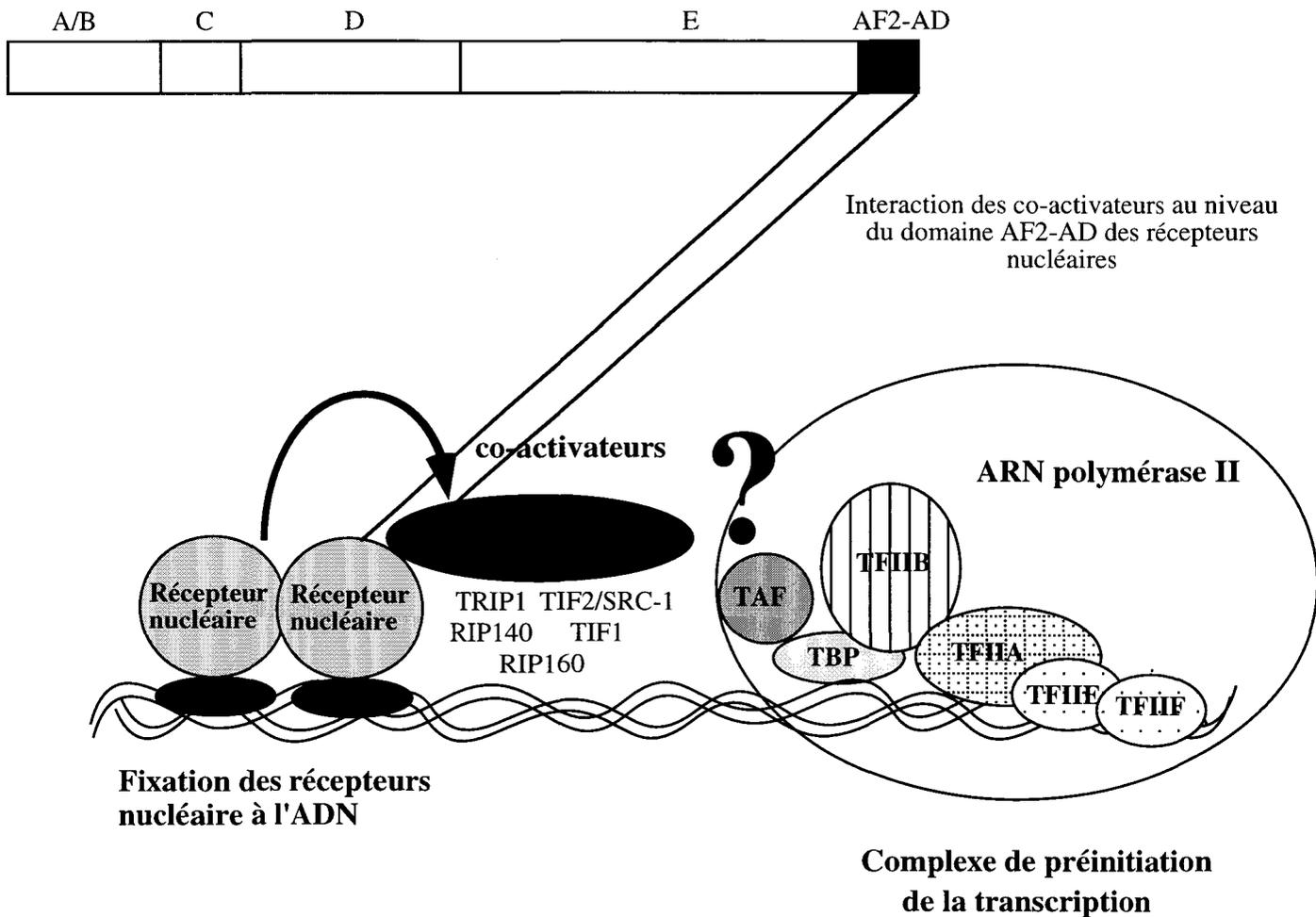
La protéine TAFII30 est un facteur associé à la protéine TBP au sein du complexe d'initiation de la transcription. Des expériences de transcription *in vitro* ont dévoilé l'importance des TAFs pour obtenir une stimulation transcriptionnelle efficace par différents récepteurs nucléaires dont ER (**figure 19, mécanisme N°2**). L'interaction de TAFII30 avec ER a été analysée par des expériences de co-rétention protéiques, dans lesquelles différents mutants du domaine AF-2 de ER fusionnés à la glutathion-S-transférase (GST) sont utilisés pour précipiter TAFII30 radiomarqué (« GST-pull down »). Ces expériences révèlent que l'association requiert un domaine situé dans la partie amino-terminale du domaine E de ER et n'est pas modulée par la présence de ligand agoniste (oestradiol) ou antagoniste (tamoxifène) (Jacq et al, 1994). L'utilisation d'un anticorps anti TAFII30 (incubé en présence de TAFII30), empêche la fixation de TAFII30 sur le domaine E de ER inhibant alors l'activité transactivatrice de ER. Ceci montre donc un effet direct de TAFII30 dans le relais de l'activité transcriptionnelle de ER *in vitro* (Jacq et al, 1994).

D'autres travaux montrent que plusieurs récepteurs nucléaires interagissent avec des TAFs. Ainsi, le récepteur de la progestérone interagit au niveau de son domaine C avec TAFII110. RXR et TR interagissent également avec TAFII110 d'une façon dépendante du ligand (revue dans Horwitz et al, 1996).

## 2) Interaction récepteur nucléaire-co-activateurs

### 2.1) Les co-activateurs en général.

Plusieurs facteurs capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires et de stimuler leur activité transcriptionnelle ont été isolés. Ces molécules ont été appelées des co-activateurs (**figure 19, mécanisme N°3 et 21**). Ainsi beaucoup de facteurs peuvent interagir avec les récepteurs nucléaires d'une manière dépendante du ligand. C'est le cas de RIP140 (pour « receptor interacting protein »), et de RIP160 (Cavaillès et al, 1994); de ERAP140 (pour « estrogen receptor associated protein »), et de ERAP160 (Halachmi et al, 1994); de TRIP1 (pour « Thyroid hormone receptor interacting protein ») (Lee et al, 1995) ou encore de TIF-1 (pour « Transcription Intermediary Factor 1 ») (Le Douarin et al, 1995).



**Figure 22:** Association entre les récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription intermédiaires (TIF1, TIF2/SRC-1, RIP140, TRIP par exemple) (**mécanisme N°3**). Ces co-activateurs ne semblent pas interagir avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle. La question de savoir s'il existe des facteurs de liaison entre ces co-activateurs et la machinerie transcriptionnelle reste donc posée.

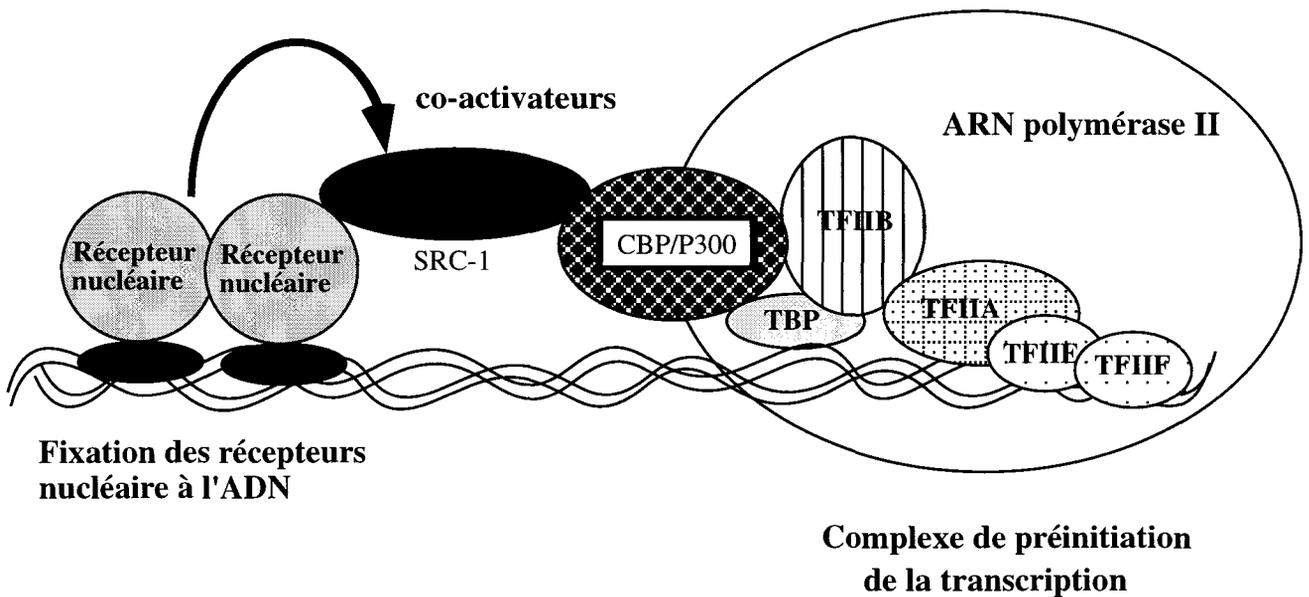
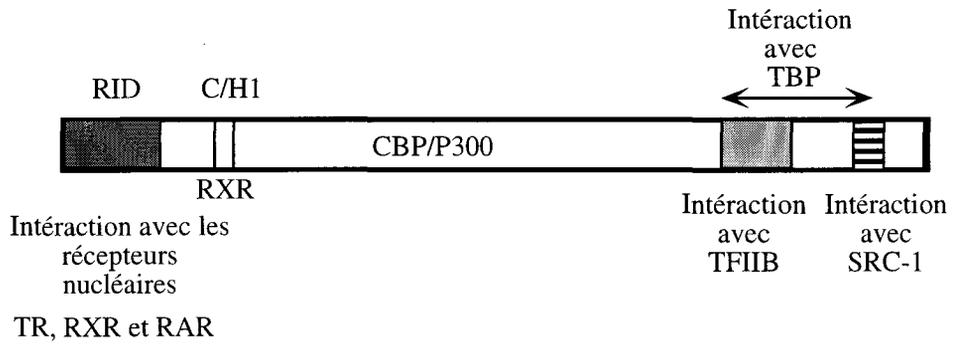
La majorité de ces co-activateurs interagissent avec le domaine AF2-AD des récepteurs et relaient la capacité transactivatrice de ces derniers. D'une façon générale, ces facteurs serviraient d'intermédiaires entre les récepteurs nucléaires et les facteurs de la machinerie transcriptionnelle. Pourtant, jusqu'à présent, ces facteurs ne semblent pas capables d'interagir avec TFIIB, TBP, ou d'autres molécules de la machinerie transcriptionnelle comme les TAFs, ce qui pose la question de leurs effets *in vivo* (Cavaillès et al, 1994; Halachmi et al, 1994, Lee et al, 1995; Le Douarin et al, 1995). L'identification toute récente de co-intégrateurs capables d'acétyler les histones commence cependant à nous faire comprendre.

## 2.2) Un exemple de co-activateur: TIF-2/SRC-1.

TIF-2 est capable d'interagir avec ER, PR, AR, RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  et TR en présence de leurs ligands respectifs (**figure 21**). C'est le domaine AF2-AD qui intervient dans la fixation de TIF-2 avec ces récepteurs (Voegel et al, 1996; **figure 22**). La présence d'antagonistes comme le 4-hydroxytamoxifène pour ER et le RU486 pour PR empêche l'interaction entre ces récepteurs et TIF-2, *in vitro*. Ceci pourrait expliquer (en partie au moins) les effets anti-oestrogéniques du tamoxifène et anti-progestatif de RU486. Ces effets pourraient être dus à la capacité de ces molécules à bloquer l'association de TIF-2 avec ER ou PR (Voegel et al, 1996). En revanche, ceci n'explique pas le fait que le 4-hydroxytamoxifène puisse être dans certains cas un agoniste de ER (revue dans Green et Chambon, 1991).

TIF-2 possède une capacité transactivatrice constitutive. Ainsi l'interaction de TIF-2 avec AR et PR *via* leur domaine AF2-AD et en présence de leur ligand respectif a pour conséquence une multiplication par 6 de l'activité transactivatrice de ces récepteurs. En revanche cette interaction ne semble avoir aucun effet sur l'activité transactivatrice de RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , VDR, TR et GR, malgré l'importante affinité de fixation qui semble les caractériser. Il semblerait donc que la co-activation produite par TIF-2 ne soit pas essentielle pour tous les récepteurs nucléaires (Voegel et al, 1996).

TIF-2 est proche d'un autre co-activateur appelé SRC-1 (pour « steroid receptor co activator-1 ») qui est capable d'interagir avec le récepteur de la progestérone PR en présence de ligand mais pas en présence d'un antagoniste comme le RU486 (Onate et al, 1995).



**Figure 23:** Représentation de l'interaction entre le co-activateur SRC-1 à la machinerie transcriptionnelle *via* CBP/P300 qui semble être le maillon manquant de la figure 22 (récepteur nucléaire - co-activateur - CBP/P300 - TFIIB et TBP - ARN polymérase II) (d'après Janknecht et Hunter, 1996).

La co-transfection de SRC-1 et de PR en présence de son ligand permet une augmentation de la transcription de 5 fois par rapport au PR seul. SRC-1 est aussi capable d'interagir et d'augmenter la transactivation médiée par GR, ER, TR et RXR en présence de leur ligand. Comme TIF-2, SRC-1 n'interagit pas avec TFIIB, TBP ni avec un grand nombre de TAFs, ce qui laisse entier le problème concernant la façon dont ces co-activateurs recrutent le complexe d'initiation de la transcription (Voegel et al, 1996; Onate et al, 1995; **figure 22**).

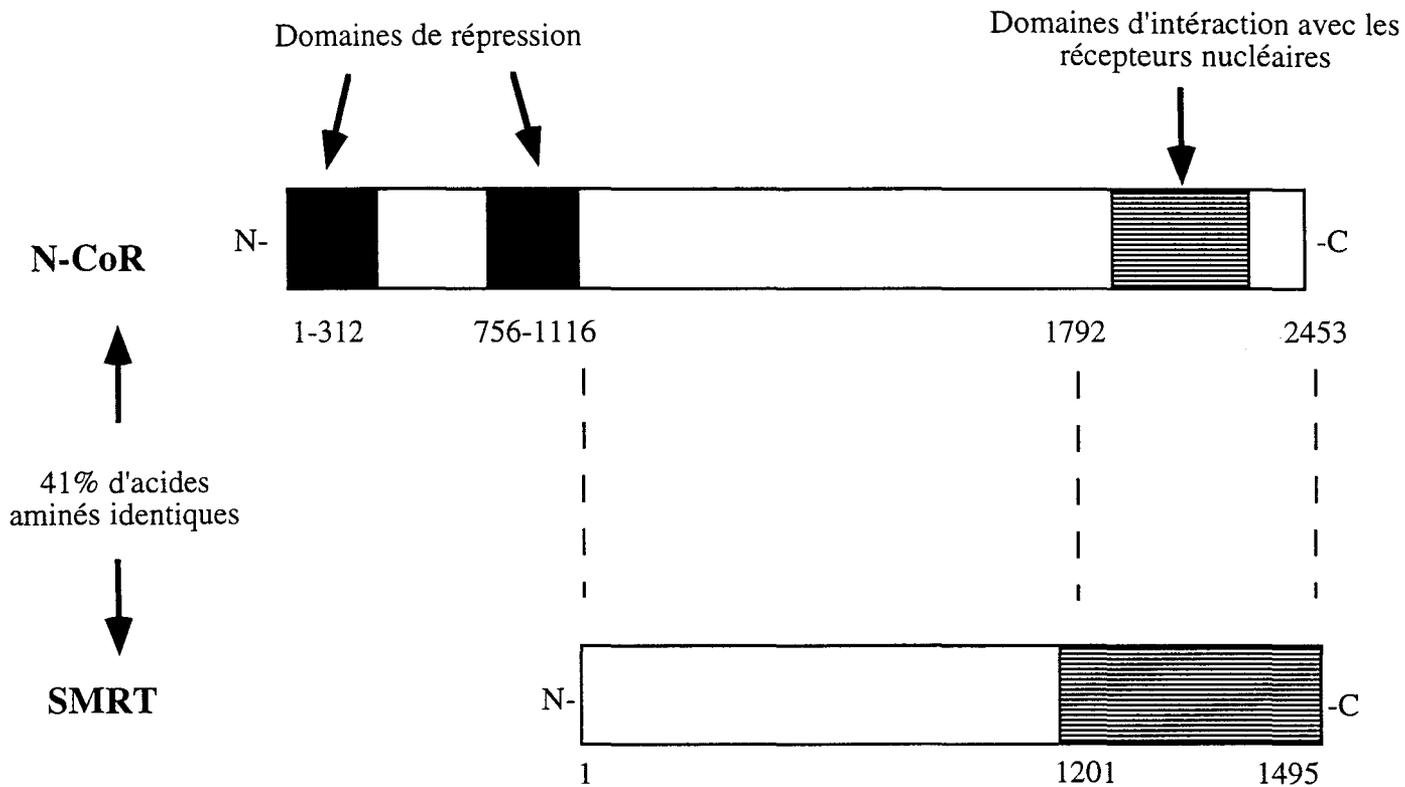
### **2.3) Les co-intégrateurs: CBP/P300.**

Il a été identifié des co-intégrateurs comme CBP (pour « CREB binding protein ») et la protéine P300 apparentée à CBP. CBP est une grande protéine de plus de 2400 acides aminés. Elle est capable d'interagir avec les récepteurs nucléaires *via* deux domaines localisés dans la partie amino-terminale.

Le premier domaine, appelé RID (pour « Receptor Interacting Domain »), qui comprend les 101 premiers acides aminés de CBP lui permet d'interagir avec TR, RXR, et RAR en présence de leur ligand. Le deuxième domaine, appelé C/H1, permet également l'interaction de CBP avec RXR (Chakravarti et al, 1996; revue dans Janknecht et Hunter, 1996; **figure 23**).

CBP et P300 agissent comme de vrais co-activateurs. En effet l'interaction de CBP/P300 avec RXR ou RXR/TR permet d'augmenter de 8 fois la capacité transactivatrice de ces récepteurs en présence de leur ligand respectif. Il en est de même pour TR et RAR en présence de ligand et de CBP/P300 (Chakravarti et al, 1996).

De plus CBP/P300 *via* sa région carboxy-terminale est capable d'interagir avec SRC-1 qui, rappelons-le, est un activateur qui interagit avec les récepteurs nucléaires mais pas avec le complexe d'initiation de la transcription (Kamei et al, 1996; **figure 23**). CBP/P300 est aussi capable d'interagir avec TFIIB et TBP. CBP/P300 apparaît donc être le lien entre SRC-1 qui interagit avec les récepteurs nucléaires et le complexe d'initiation transcriptionnelle (TFIIB et TBP) (revue dans Janknecht et Hunter, 1996; **figure 23**).



**Figure 24:** Principaux domaines des co-répresseurs N-CoR et SMRT (d'après Gelman et al, 1997)

Enfin CBP/P300 possède une autre caractéristique importante, à savoir son activité d'acétylation des histones (Ogryzko et al, 1996). Le degré d'acétylation de la chromatine est corrélé à son activité transcriptionnelle, les régions les plus fortement acétylées étant transcriptionnellement plus actives (Pazin et Kadonaga, 1997). CBP/P300 *via* une activité intrinsèque est capable d'acétyler les histones ce qui entraînerait donc une augmentation de la transcription. Il peut également s'associer avec le facteur PCAF (pour « P300/CBP Associated Factor ») qui est lui aussi capable d'acétyler les histones (Ogryzko et al, 1996). CBP/P300 pourrait donc directement contribuer à la régulation de la transcription *via* sa propriété à acétyler les histones.

### **3) Interaction récepteur nucléaire/co-répresseur: SMRT et N-CoR.**

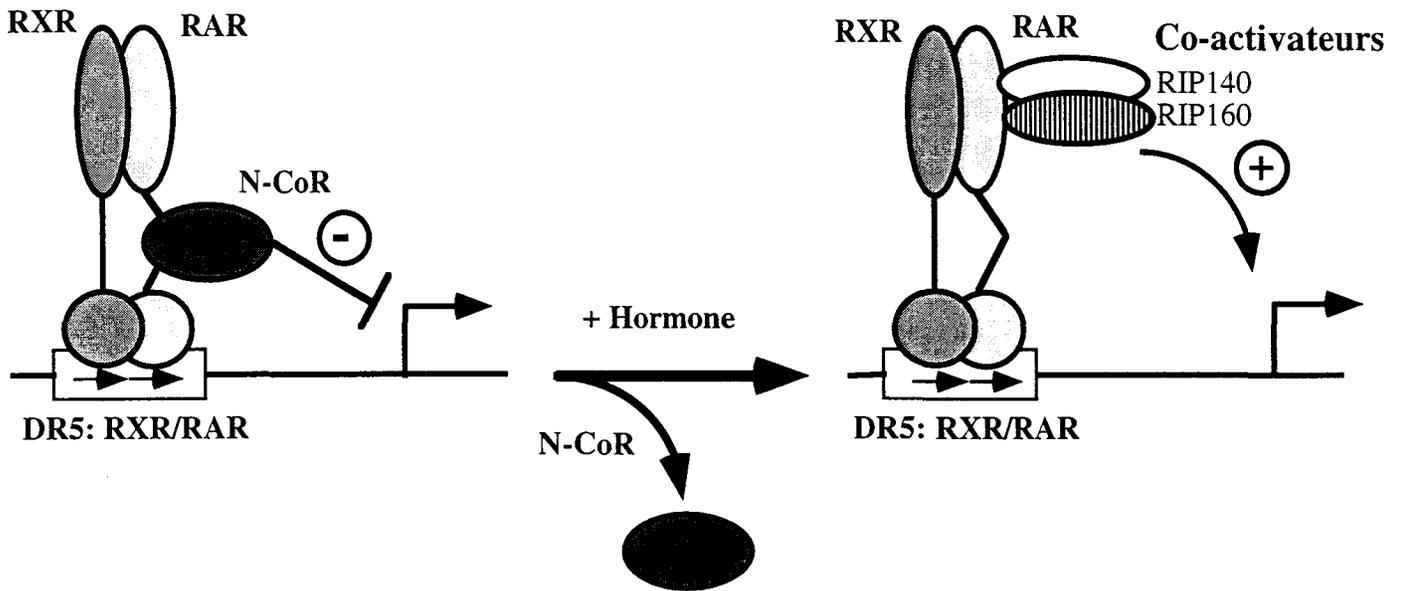
La plupart des récepteurs nucléaires sont des activateurs de la transcription mais certains d'entre eux peuvent également jouer un rôle de répresseur. En effet, TR et RAR ont la particularité de pouvoir réprimer activement la transcription en absence d'hormone. La répression est due à la fixation à TR et RAR de co-répresseurs N-CoR (pour « Nuclear receptor Co-Repressor ») ou SMRT (pour « Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors »).

#### **3.1) N-CoR.**

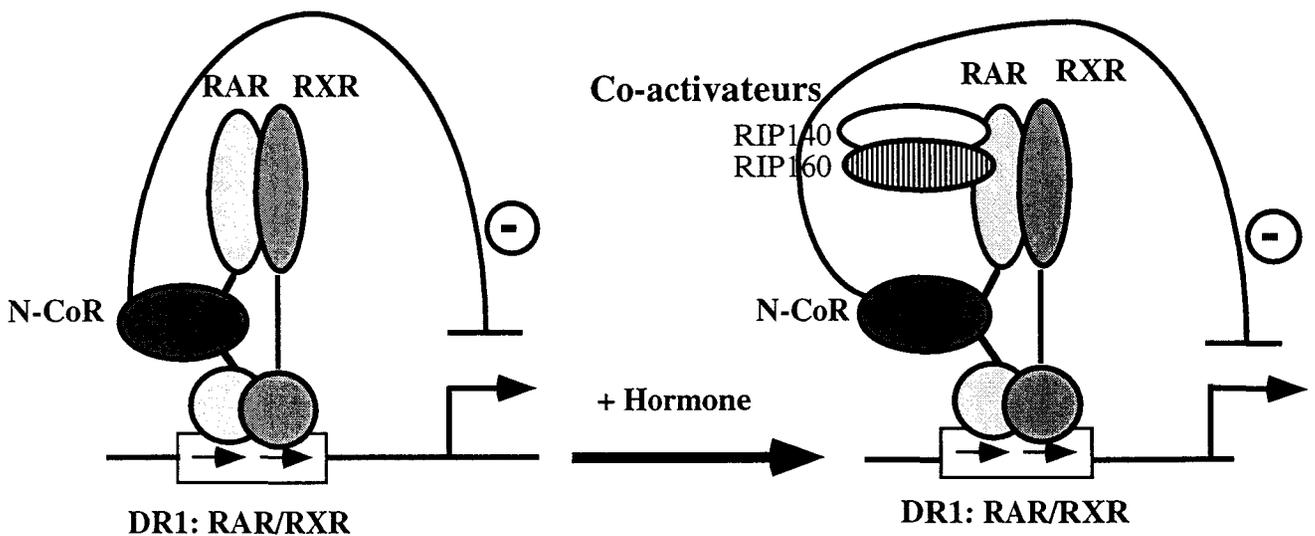
N-CoR, découvert par l'équipe de Michael Rosenfeld, est une protéine qui se fixe à RAR et TR $\beta$ 1 *via* son extrémité carboxy-terminale, mais pas à ER, GR, VDR ou encore à RXR (**figure 24**). L'interaction avec RAR ou TR $\beta$ 1 est abolie par la fixation du ligand. Ainsi la libération de N-CoR est dépendante de la fixation de T3 et de l'acide rétinoïque pour TR $\beta$ 1 et RAR $\alpha$ 1 respectivement (Horlein et al, 1995).

Des mutations dans TR $\beta$ 1 ont permis de cartographier le site de liaison de ce récepteur avec N-CoR. Ce site comprend une grande partie de la première hélice (H1) du domaine E de TR $\beta$  appelé « boîte coR » (Wagner et al, 1995; Kurokawa et al, 1995; **figure 15A**).

A



B



**Figure 25:** Représentation schématique des interactions entre les hétérodimères RAR-RXR et les facteurs qui modulent leur activité transcriptionnelle.

Les co-activateurs transcriptionnels que sont RIP140 et RIP160 sont recrutés seulement en présence de ligand de RAR et cela indépendamment de la nature de l'élément de réponse (DR1 ou DR5). (A) En revanche, la dissociation de N-CoR en présence du ligand n'a lieu que lorsque les récepteurs adoptent une conformation particulière obtenue après liaison sur un élément de type DR5 (où RAR est en position aval). (B) La non-dissociation du co-répresseur lorsque l'hétérodimère RAR-RXR est fixé sur un élément DR1 (où RAR est positionné en amont) expliquerait l'absence de transactivation (d'après Kurokawa et al, 1994).

D'autres mutations, mais cette fois dans les récepteurs orphelins Rev-erb ont permis d'identifier deux autres régions qui interviennent dans l'interaction avec N-CoR: un domaine en aval de la « boîte coR » dans le domaine D et un deuxième domaine à l'extrémité carboxy-terminale du domaine E (Zamir et al, 1996).

L'activité répressive intrinsèque de N-CoR a été testée en fusionnant diverses régions de N-CoR au domaine de fixation à l'ADN de GAL4 et en montrant que les protéines chimères ainsi produites sont capables d'inhiber la transcription de 15 à 25 fois (Horlein et al, 1995). Des mutations dans TR $\beta$ 1, qui inhibent l'activité répressive en absence du ligand de ce récepteur, inhibent également la fixation du co-répresseur, ce type d'expérience permet donc de faire un lien direct entre l'activité répressive de ce récepteur et sa liaison avec N-CoR (Horlein et al, 1995).

N-CoR ne semble pouvoir se fixer que sur des dimères et pas sur des monomères. Ainsi Rev-erb ou TR $\alpha$  fixés sous forme de monomères sur leurs éléments de réponse respectif ne fixent pas N-CoR. En revanche lorsque Rev-erb et TR $\beta$ 1 sont fixés à l'ADN sous forme d'homodimères respectivement sur des éléments de type RevDR2 ou DR4, ils peuvent interagir avec N-CoR. De même N-CoR interagit peu avec RXR seul. En revanche la présence de TR $\alpha$  et TR $\beta$  comme partenaires de RXR permet l'interaction avec N-CoR. Il apparaît donc que la fixation de N-CoR nécessite la présence de récepteurs fixés à l'ADN sous forme de dimères que ce soient des homodimères ou des hétérodimères (Zamir et al, 1997).

Le groupe de Glass et Rosenfeld a écrit une page supplémentaire de l'histoire de N-CoR en montrant que ce facteur est vraisemblablement responsable des variations d'activités des différents types d'hétérodimères formés entre RAR et RXR. Rappelons que selon l'élément de réponse (DR1 ou DR5), RAR et RXR ne forment pas le même type de complexe: on observe un complexe RXR-RAR sur un élément DR5 et un complexe RAR-RXR sur un élément DR1 (Kurokawa et al, 1994; **figures 25A et B**). Or sur un élément DR1, le complexe RAR-RXR est transcriptionnellement inactif en présence de ligands de RAR, bien que l'on puisse observer la fixation de co-activateurs sur ce complexe. Comment expliquer ce phénomène? Le groupe de Glass et Rosenfeld a montré que, contrairement à ce qui se passe sur un élément DR5 (**figure 25A**), la présence du ligand n'entraînait pas la dissociation de N-CoR du complexe RAR-RXR

fixé à un DR1 (**figure 25B**). Donc, N-CoR restant fixé, le complexe reste inactif bien que le ligand soit présent et les co-activateurs fixés. Ce travail montre de plus qu'il n'y a pas forcément antagonisme entre fixation des co-répresseurs et fixation des co-activateurs.

### 3.2) SMRT.

La majorité des propriétés de SMRT correspondent à celles qui ont été mises en évidence pour N-CoR. SMRT est une protéine qui est capable de s'associer avec RAR et TR et pas avec RXR (Chen et Evans, 1995). Comme N-CoR, SMRT interagit avec ces récepteurs *via* son domaine carboxy-terminal (**Figure 24**). La fixation du ligand entraîne la libération de SMRT et permet de lever la répression médiée par le récepteur *via* la fixation de ce co-répresseur.

L'activité répressive intrinsèque de SMRT a été testée en fusionnant diverses régions de SMRT au domaine de fixation à l'ADN de GAL4. Ainsi les protéines chimères produites sont capables d'inhiber la transcription de 30 à 35 fois. (Chen et Evans, 1995).

Enfin, comme pour N-CoR, SMRT interagit avec des récepteurs qui se fixent à l'ADN sous forme de dimère et non sous forme de monomères (Zamir et al, 1997).

### 3.3) Informations de dernière minute!

Comme nous l'avons discuté auparavant les régions les plus fortement acétylées de la chromatine sont transcriptionnellement plus actives. Inversement, la déacétylation des histones conduit à une répression de la transcription. Tout récemment N-CoR et SMRT se sont montrés capables d'interagir avec des protéines capable de déacétyler les histones. Cette déacétylation est alors responsable de la répression de la transcription (Nagy et al, 1997; revue dans Pazin et Kadonaga, 1997).

En conclusion, les co-répresseurs et les co-activateurs des récepteurs nucléaires semblent jouer un rôle soit indirect soit direct dans le changement de conformation de la chromatine. Ceci serait à l'origine de la répression et de l'activation de la transcription médiée par ces facteurs de manière dépendante du ligand: (i) La répression médiée par la fixation de SMRT et de N-CoR serait due à la déacétylation des histones. (ii) La fixation du ligand entraîne

**Acides gras poly-insaturés :**

Acide linoléique: C18:3 $\omega$ 3

Acide linoléique: C18:2 $\omega$ 6

Acide arachidonique C20:4 $\omega$ 6



**Acide gras mono-insaturé :**

Acide oléique: C18:1 $\omega$ 9



**Acides gras saturés :**

Acide myristique: C14

Acide palmitique: C16

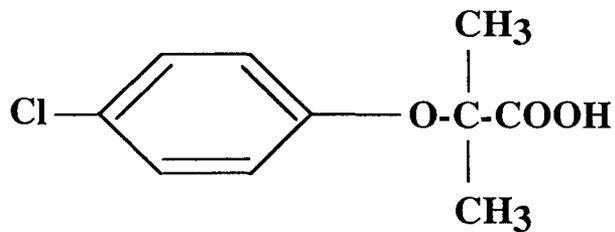
Acide stéarique: C18



**Proliférateurs de péroxysomes :**

**Hypolipémiants :**

Acide chlofibrique



**Figure 26:** Représentation chimique des activateurs des PPARs.

la libération de ces co-répresseurs et permet aux co-activateurs de se fixer sur les récepteurs. (iii) Ces co-activateurs augmentent la transcription *via* l'acétylation des histones. Ainsi, l'équipe de O'Malley vient de montrer que SRC-1 est une histone-acétylase (Spencer et al, 1997).

### **III Les récepteurs nucléaires orphelins.**

Il y a de ça dix ans, personne ne pouvait imaginer que les récepteurs nucléaires orphelins allaient devenir un ensemble de protéines aussi important qui représente 75% de la totalité de la famille des récepteurs nucléaires (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996). La plupart des récepteurs orphelins, pour lesquels des ligands n'ont pas encore été mis en évidence, ont été isolés sur la base de leur identité de séquences avec les récepteurs des stéroïdes. Dire que le ligand n'est pas connu ne signifie évidemment pas que ce ligand n'existe pas. Les récepteurs PPARs en sont la preuve puisque récemment, des ligands ont été identifiés pour PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Cependant, dans la plupart des cas, les récepteurs orphelins continuent à nous poser un véritable défi au point de vue fonctionnel et la chasse au ligand reste d'une actualité brûlante.

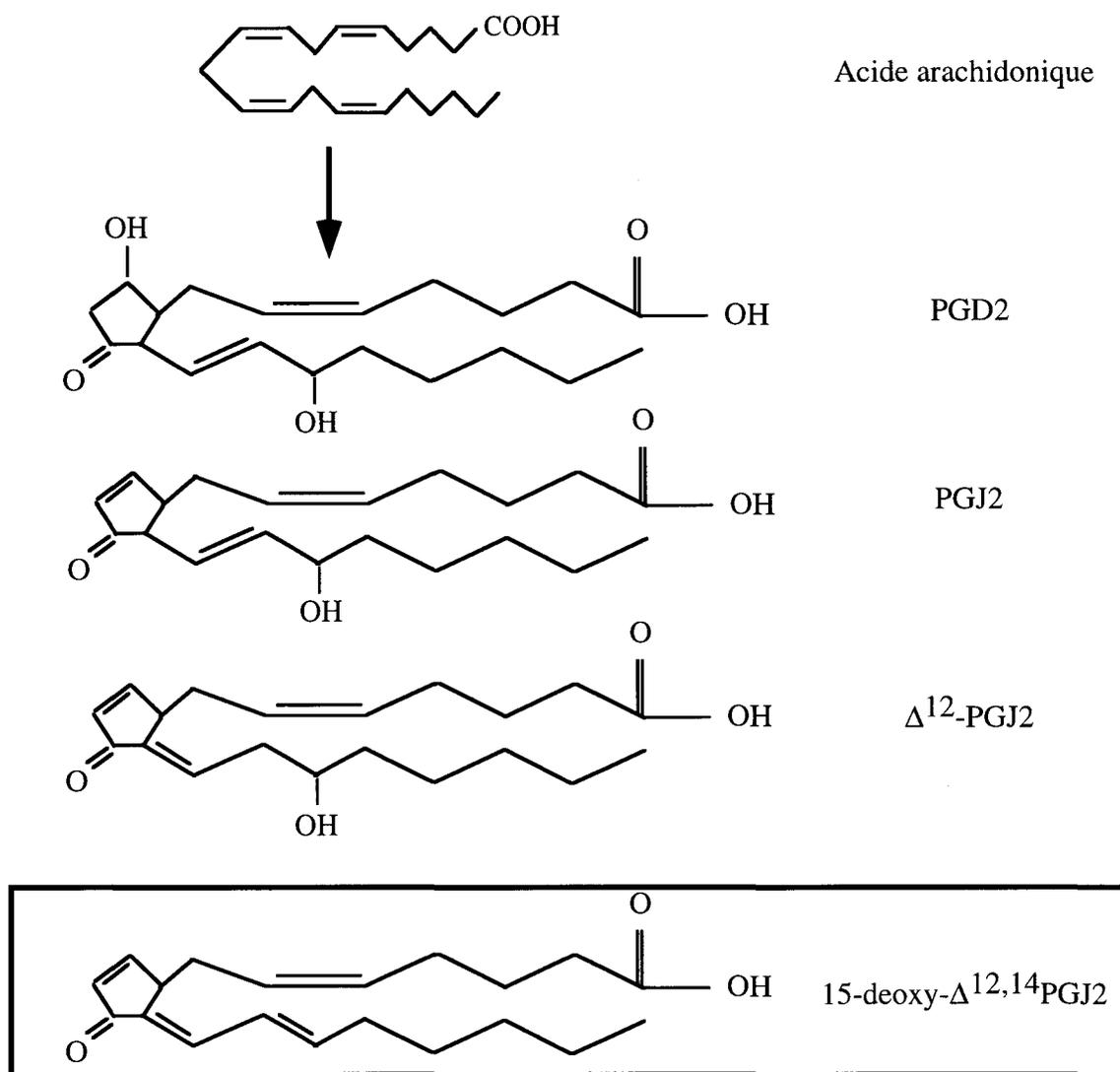
#### **1) Ligands et Activateurs.**

##### **1.1) Mise en évidence de ligands.**

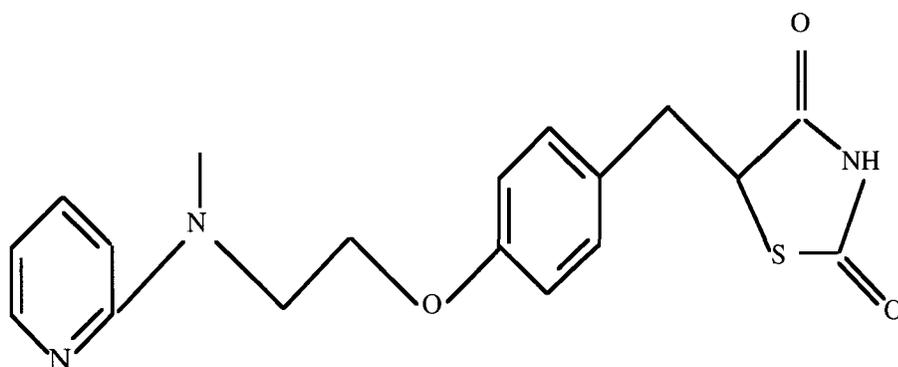
###### **1.1.1) RXR et PPARs.**

La première solution au problème du mode d'action des récepteurs orphelins consisterait à leur trouver des ligands. Ces récepteurs constituent donc une remarquable voie d'approche pour la découverte de nouvelles molécules actives. Ce point est bien illustré par l'exemple de RXR et de l'acide rétinoïque 9-*cis* et plus récemment, par la découverte des ligands des PPARs.

RXR fut le premier récepteur orphelin pour lequel un ligand potentiel avait été suspecté. En effet, dans des tests de transactivation, RXR était activé par de hautes concentrations d'acide rétinoïque tout-*trans* mais ne le fixait pas. L'hypothèse fut alors que le ligand de RXR était un métabolite de l'acide rétinoïque tout-*trans*.



Thiazolidinedione à propriété antidiabétique, le ligand synthétique: BRL 49653

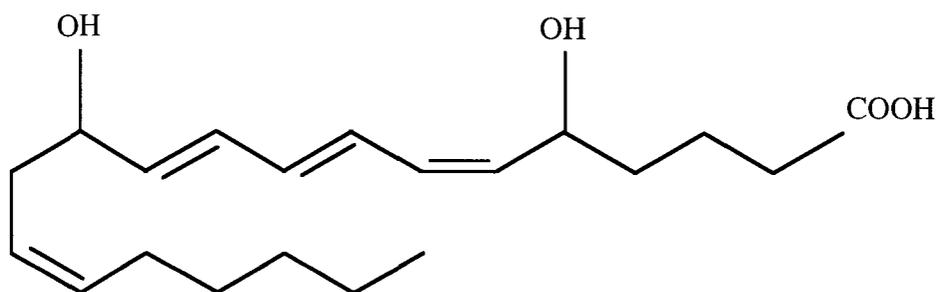


**Figure 27:** Structure chimique des ligands de PPAR $\gamma$  :le ligand naturel, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ2 et le ligand synthétique BRL 49653.

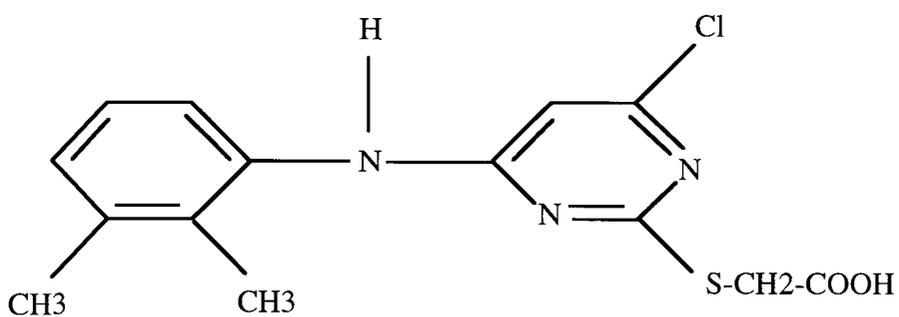
C'est ainsi que l'acide rétinoïque 9-*cis* a été effectivement identifié comme étant un ligand de forte affinité pour RXR (Levin et al, 1992; revue dans Laudet et Stehelin, 1992).

L'histoire des PPARs est par certains égards proche de celle de RXR. En effet, dès leur découverte en 1990 par l'équipe de Stephen Green, le récepteur PPAR $\alpha$  a été décrit comme pouvant être activé par certaines molécules synthétiques comme les proliférateurs de péroxysomes, par exemple l'acide chlofibrique (Isseman et Green, 1990). Peu après l'équipe de Walter Wahli a montré que les trois PPARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) découverts chez le Xénope pouvaient être activés par des molécules naturelles: les acides gras (Dreyer et al, 1992; Gottlicher et al, 1992). C'est le cas des acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, ou mono-insaturé comme l'acide oléique (Gottlicher et al, 1992; Rodriguez et al, 1994; **figure 26**). Ceci a donc permis de suggérer que les ligands de ces récepteurs étaient des dérivés des acides gras et la recherche de leurs ligands potentiels s'est orientée vers ce type de molécules. Ainsi, récemment, un dérivé de l'acide arachidonique, la prostaglandine 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2, a été identifiée comme étant le ligand naturel de PPAR $\gamma$ , capable de se fixer sur ce récepteur et de mettre en route son activité transcriptionnelle (Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995; revue dans Lemberger et al, 1996; **figure 27**). Un ligand synthétique a également été identifié pour PPAR $\gamma$ . En effet, l'antidiabétique synthétique BRL49653 est lui aussi capable de se fixer sur PPAR $\gamma$  et de mettre en route son activité transactivatrice (Forman et al, 1995; Lehmann et al, 1995). La spécificité de réponse de ces molécules est impressionnante puisqu'elles n'ont que très peu d'effet sur des récepteurs très proches de PPAR $\gamma$  comme PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  (Dreyer et al, 1992; Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995). Ceci suggère donc que PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  possèdent des ligands dérivant des acides gras comme PPAR $\gamma$  mais qui diffèrent des prostaglandines. Ceci s'est confirmé avec l'identification du ligand naturel de PPAR $\alpha$ . C'est ainsi que les leucotriènes B4 (LTB4), eux aussi des dérivés de l'acide arachidonique, ont été identifiés comme étant les ligands naturels de PPAR $\alpha$  (Devchand et al, 1996). Un ligand synthétique de PPAR $\alpha$  avait été mis en évidence depuis longtemps. Il s'agit de l'acide pirinixique (WY 14,643), agent hypolipémiant, proliférateur de péroxysome. Celui-ci était connu depuis longtemps pour activer les PPARs et a été montré récemment capable de se fixer sur PPAR $\alpha$  et de mettre en route son activité transactivatrice (Devchand et al, 1996;

## Leucotriène B4



## Proliférateur de peroxyssome Hypolipémiant: Acide pirinixique WY 14,643

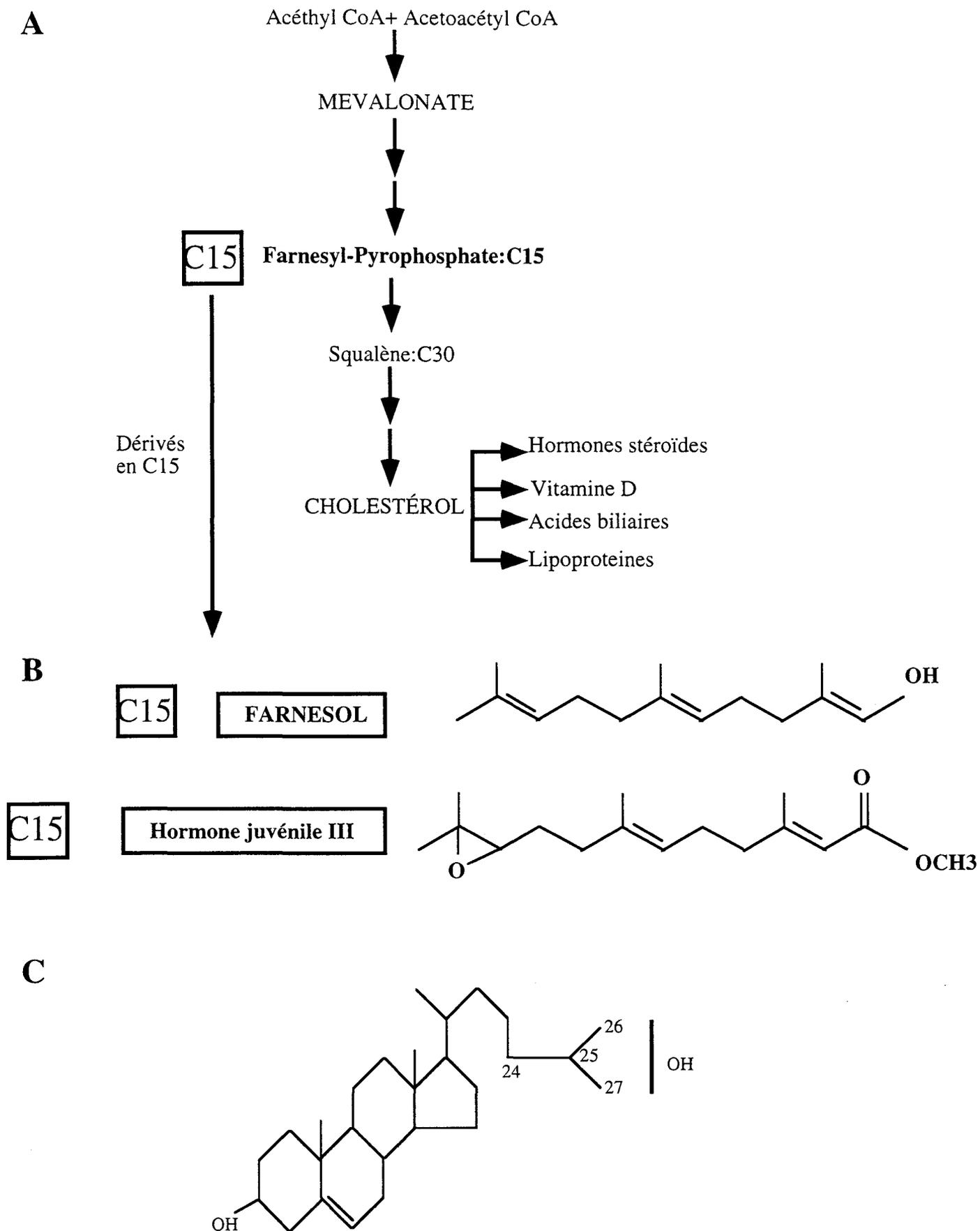


**Figure 28:** Représentation chimique des ligands naturel (leucotriène B4) et synthétique (acide pirinixique, WY 14,643) de PPAR $\alpha$ .

**figure 28**). Comme pour les prostaglandines et PPAR $\gamma$ , LTB<sub>4</sub> est spécifique de PPAR $\alpha$ . Cela suggère que chacun des trois gènes PPARs des vertébrés va avoir un ligand spécifique, ce qui est une situation bien différente de celle de TR et RAR. En tous cas ceci démontre bien que certains récepteurs orphelins peuvent fixer des ligands et être activés par eux. L'identification de LTB<sub>4</sub> et PGJ<sub>2</sub> comme ligands naturels des PPARs (respectivement  $\alpha$  et  $\gamma$ ) ne signifie pas que ces molécules sont les seules capables de se fixer et d'activer ces récepteurs. En effet des résultats récents non publiés, obtenus par l'équipe de Kliewer et Willson chez Glaxo, montrent que PGJ<sub>2</sub> remplit moins de la moitié de la grande poche hydrophobe présente dans le domaine E de PPAR $\gamma$ . Il est donc possible que d'autres molécules plus grandes viennent se fixer sur PPAR $\gamma$ . Ceci montre bien que le problème du ligand naturel n'est pas encore complètement élucidé.

#### 1.1.2 Une nouvelle méthode d'identification de ligand: le test CARLA

La mise en évidence de ces ligands permet donc de penser que d'autres ligands vont être identifiés dans les années à venir. Des nouvelles techniques plus rapides que le test de Scatchard (c'est-à-dire un test de fixation classique à l'aide de ligand marqué), se sont donc développées récemment. C'est le cas de la technique CARLA (pour « co-activator-dependent receptor ligand assay ») qui est basée sur l'hypothèse que la fixation du ligand sur le récepteur va induire la fixation de co-activateurs comme SRC-1 sur ce récepteur (Krey et al, 1997). Cette fixation du co-activateur en présence du ligand potentiel est testée par co-rétention protéique à l'aide de système GST. Le niveau de rétention de SRC-1 sur le domaine E d'un récepteur choisi, fusionné à la protéine GST devient alors l'indice d'une fixation du ligand sur le récepteur. Plus cette valeur est grande plus le ligand testé est considéré comme un bon ligand. C'est par cette technique que les bezafibrates ont pu être identifiés comme de potentiels ligands de PPAR $\beta$ . Cette nouvelle technique est d'autant plus intéressante qu'elle n'utilise pas de ligands radiomarqués comme pour le Scatchard et qu'elle permet de tester à plus grande échelle de nombreux ligands potentiels. L'amélioration des techniques va donc sans doute faciliter la mise en évidence de nouveaux ligands dans un futur proche.



**Figure 29:** Exemples de molécules activatrices. (A) Voie de synthèse du cholestérol par le mévalonate à partir duquel les activateurs de FXR (B) le farnésol et l'hormone juvénile III (composés en C15) sont synthétisés. (C) Les différents activateurs de type oxystérol de LXR et SF-1. Ces molécules ont un groupement hydroxyle situé sur les carbones 24, 25, 26 et 27 sur le bras du squelette cholestérol.

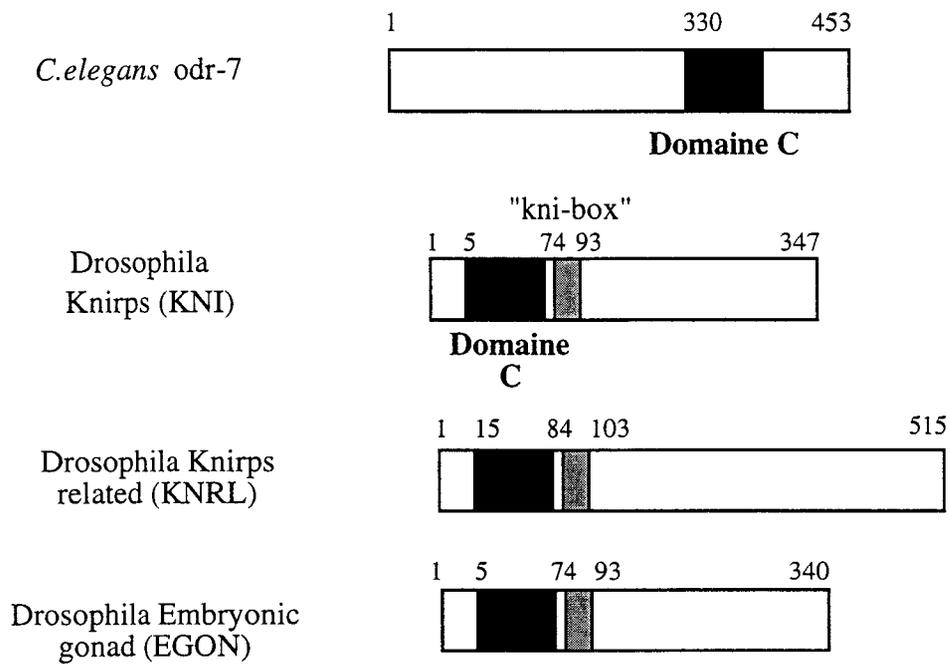
## 1.2) Mise en évidence de molécules activatrices.

Si, comme nous venons de le voir, pour certains récepteurs « orphelins » la question de l'existence du ligand a été élucidée, il n'en reste pas moins que cette question continue de se poser pour la majorité des récepteurs orphelins.

Une possibilité pour identifier des ligands potentiels de récepteurs orphelins consiste, dans un premier temps, à savoir si ces récepteurs peuvent être activés par des ligands. Pour cela, des expériences de co-transfection et de transactivation ont constitué une approche de recherche, très féconde. Cette méthode consiste à réaliser une co-transfection transitoire dans des cellules, de deux types d'éléments: (i) un vecteur d'expression codant un récepteur orphelin donné qui va permettre la surexpression de ce récepteur; (ii) un vecteur rapporteur contenant un gène indicateur, un promoteur minimal, et l'élément de réponse de ce récepteur orphelin cloné en amont du promoteur minimal. L'activité du gène indicateur mesurée en présence ou en absence de l'activateur putatif testé permettra de savoir si cette molécule est active ou non (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996).

L'utilisation de systèmes robotiques et de tests en série de milliers de molécules par jour vont sans doute permettre l'identification de molécules activatrices de récepteurs orphelins (revue dans Enmark et Gustafsson, 1996). Plusieurs molécules activatrices ont déjà été découvertes pour certains récepteurs orphelins, ce qui va permettre de mieux cibler la recherche du ligand naturel de ces récepteurs.

Des métabolites intervenant dans la chaîne de biosynthèse du cholestérol comme le farnesol ou l'hormone juvénile se sont avérés être des activateurs du récepteur FXR (pour « farnesoid X-activated receptor ») (Forman et al, 1995; **figure 29**). Cette activation de FXR par le farnesol n'est cependant pas reproduite par d'autres équipes comme celle de David Moore qui observe que FXR peut-être activé par certains rétinoïdes (cité dans Perlman et Evans, 1997). Plus récemment, des oxystérols qui sont des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol ont aussi été mis en évidence comme étant des activateurs de LXR et SF-1. Le 24(S),25-epoxycholestérol et le 24(S)-hydroxycholestérol sont capables d'activer LXR tandis que le 25-, 26-, et le 27-hydroxycholestérol activent SF-1 (Lehmann et al, 1997; Lala et al, 1997; **figure 29**).



**Figure 30** : Structure schématique des récepteurs "atypiques" possédant uniquement le domaine C. odr-7 et les 3 gènes du groupe KNI ne sont pas apparentés.

Toutes ces molécules capables d'activer ces récepteurs orphelins n'en sont pas pour autant des ligands réels. En effet elles n'ont pas été montrées capables de se fixer sur LXR ou SF-1 et de les activer. Cependant leur identification suggère que des métabolites de ces oxystérols peuvent être les ligands naturels de ces récepteurs. Cette démarche a déjà fait ses preuves. L'hypothèse de métabolites des acides gras comme ligands des PPARs s'est effectivement vérifiée par la suite, les ligands naturels de ces récepteurs étant rappelons-le des dérivés de l'acide arachidonique.

En conclusion, la découverte de molécules capables d'activer des récepteurs orphelins suggère que certains de ces récepteurs, aujourd'hui dits orphelins, rejoindront bientôt l'ensemble des récepteurs classiques capables d'être activés *via* la fixation d'un ligand. Mais jusqu'à présent le mystère reste entier pour la majorité des récepteurs orphelins. La chasse au ligand continue mais il n'est pas impossible que certains de ces orphelins ne possèdent pas de ligand du tout. On peut imaginer sans peine que des récepteurs qui ne possèdent pas de domaine de fixation du ligand, soient effectivement de vrais orphelins.

## 2) odr-7, KNI: des « vrais » orphelins.

Si la plupart des récepteurs orphelins possèdent une structure en domaines conservés, il existe quelques exemples de récepteurs qui ne possèdent pas de domaines E. C'est le cas de odr-7 qui ne possède qu'un domaine C. Il a été isolé chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et intervient dans la réponse olfactive du nématode (Sengupta et al, 1994; **figure 30**). C'est aussi le cas pour un groupe de trois gènes: KNI (knirps), KNRL (pour « knirps related ») et EGON (pour « embryonic gonad ») (Rothe et al, 1989; Oro et al, 1988). Ils ont été isolés chez la drosophile et jouent un rôle dans la segmentation de l'embryon. Ceux-ci ne possèdent qu'un domaine C ainsi qu'un motif de 19 acides aminés adjacent à la région des doigts de zinc appelé « kni-box » dont la fonction reste encore un mystère (**figure 30**).

La conservation du domaine C semble suggérer que ces récepteurs sont capables de se fixer sur le même type d'élément de réponse que les récepteurs nucléaires classiques. De plus, la boîte P de ces récepteurs est relativement conservée même si quelques résidus diffèrent, ce qui laisse penser que ces récepteurs pourront effectivement se fixer sur la séquence

Récepteurs nucléaires	Boîte P	Séquence cible
TR, RAR, VDR, RXR, PPAR, NGFI-B, NURR-1, USP, RZR, Rev-erb etc.	cEGckG	PuGGTCA
v-erbA, COUP-TFI, COUP-TFII, KNI, EGON, KNRI	cEGckS	PuGGTCA
ER $\alpha$ , ER $\beta$	cEGckA	PuGGTCA
SF-1	cESckG	PuGGTCA
ERR-1, ERR-2	cEAckA	PuGGTCA
GR, MR, PR, AR	cGSckV	AGAACA

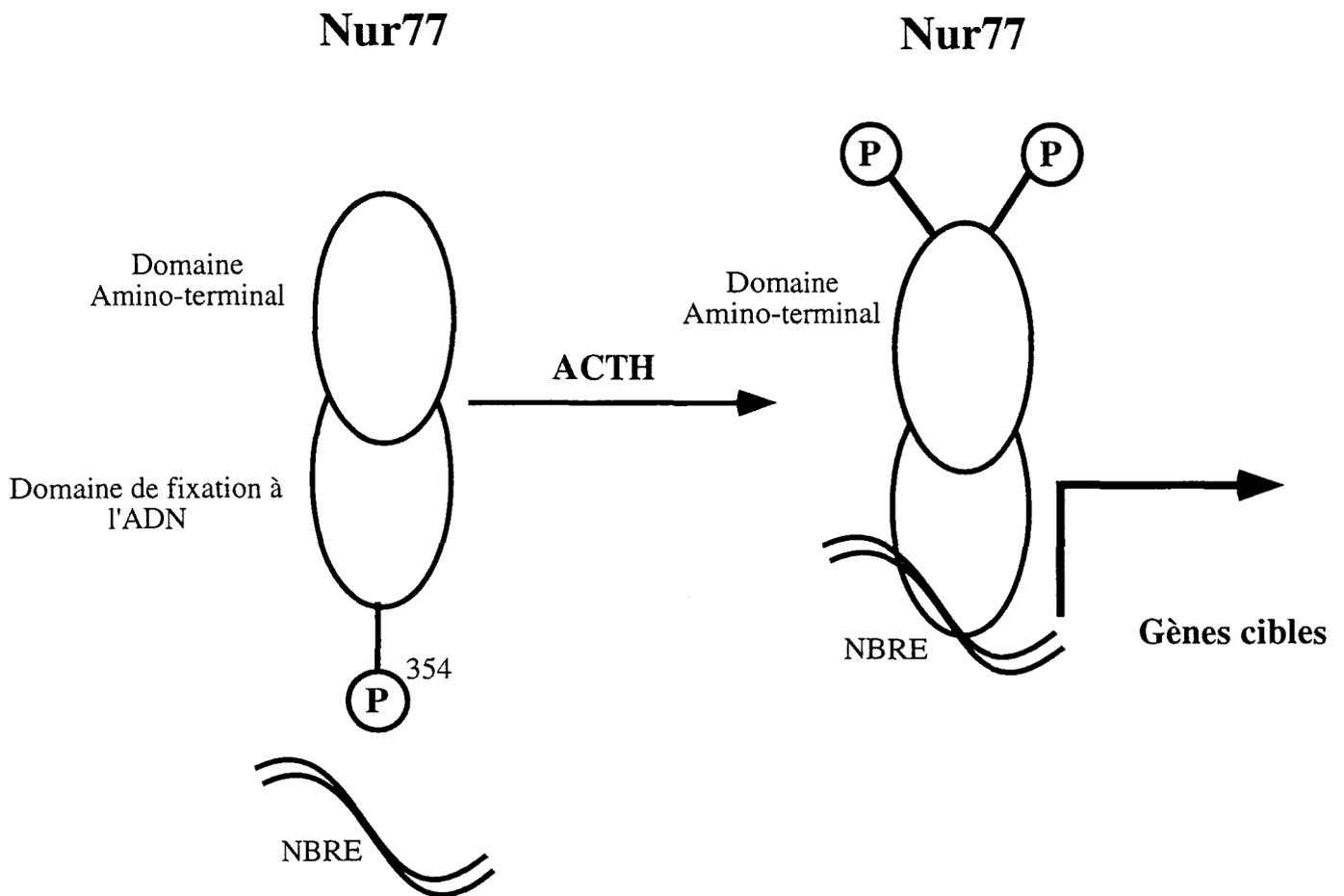
**Figure 31:** Séquences en acides aminés des boîtes P et leurs séquences cibles (d'après Gronemeyer et Laudet, 1995). Les récepteurs nucléaires orphelins possèdent une boîte P qui est responsable de la spécificité de reconnaissance des HREs comme les récepteurs à ligand.

AGGTCA (**figure 31**). Ceci a été montré pour le récepteur KNI qui est capable de se fixer sous forme de monomère sur un élément de réponse proche de celui des récepteurs nucléaires (Hoch et al, 1992). Si la fixation à l'ADN de ces récepteurs peut être conservée, la fixation d'un ligand semble être, elle, grandement compromise. En effet, l'absence du domaine E chez ces quatre récepteurs nous pousse à nous demander comment ils pourraient être régulés. Il est difficile aujourd'hui de répondre à cette question mais la mise en évidence d'autres moyens d'activation comme la phosphorylation permettra peut-être d'élucider ce mystère.

### **3) La phosphorylation: un mode de régulation des récepteurs nucléaires en absence de ligand.**

#### **3.1) Phosphorylation et activités des récepteurs.**

Dans le cas où un récepteur orphelin ne fixerait pas de ligand, comment envisager alors la régulation de sa capacité transactivatrice? Une réponse possible à cette question est la phosphorylation. Ce processus a déjà été montré capable d'activer la transactivation de récepteurs classiques comme ER $\alpha$  en absence de ligand. La mise en route de l'activité transactivatrice de ER $\alpha$  semble, en effet, dépendre de la phosphorylation de la sérine 118 localisée dans le domaine AF-1 de ER $\alpha$  en absence de ligand (Bunone et al, 1996). Un autre résidu, la tyrosine Y537, située dans le domaine AF2-AD de ER $\alpha$ , semble aussi pouvoir jouer un rôle essentiel dans l'activité de ce récepteur en absence de ligand. Cette tyrosine peut être phosphorylée en absence comme en présence de ligand (Arnold et al, 1995). La mutation de ce résidu Y537 induit la formation d'un récepteur capable de transactiver de manière constitutive. On obtient donc un récepteur dont l'activité AF-2 n'est plus dépendante du ligand. De plus ce résidu semble intervenir dans l'interaction de ER $\alpha$  avec les co-activateurs RIP-140 et SRC-1 (Weis et al, 1996, White et al, 1997). L'interaction entre le récepteur ER muté dans son résidu Y537 et les co-activateurs RIP-140 et SRC-1 est observée même en absence d'oestradiol. On peut donc imaginer que la phosphorylation de cette tyrosine maintient le domaine AF2-AD sous forme inactive et empêche la fixation de co-activateurs. Une fois déphosphorylée par un mécanisme qui reste à déterminer, ce résidu permet aux co-activateurs de se fixer et donc



**Figure 32:** Effet de l'ACTH sur la phosphorylation de Nur77. La déphosphorylation de la Sérine 354 permet au récepteur de se fixer à l'ADN sur un NBRE. Nur77 est aussi hyperphosphorylé dans sa région amino-terminale ce qui lui confère ses capacités transactivatrice.

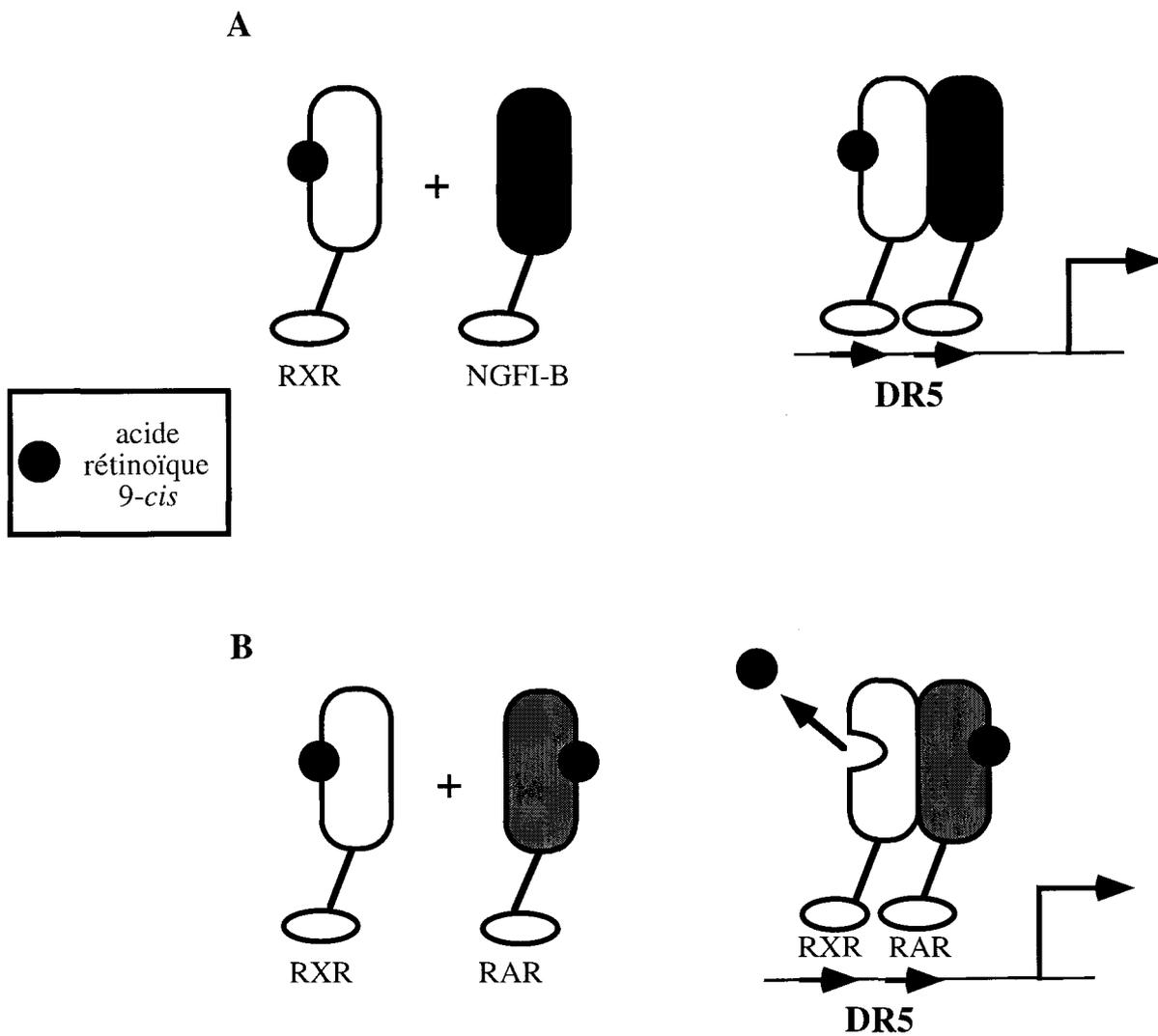
d'activer ER $\alpha$  (Weis et al, 1996, White et al 1997). Ceci montre que la phosphorylation est, à elle seule, capable de mettre en route l'activité transcriptionnelle d'un récepteur et d'induire la fixation de co-activateurs. Ceci a été montré pour ER $\alpha$  et pourrait donc s'appliquer aux récepteurs orphelins en général. Ceux-ci pourraient fixer des co-activateurs et donc être activés même s'ils ne possèdent pas de ligand. D'ailleurs, on sait que de nombreux récepteurs orphelins sont phosphorylés (revue dans Gronemeyer et Laudet, 1995).

En conclusion, la fixation d'un ligand n'est pas le seul mécanisme pouvant activer un récepteur nucléaire. L'activation *via* la phosphorylation en est la preuve et pourrait donc constituer un mode d'activation des récepteurs orphelins en absence de ligand.

### 3.2) Phosphorylation et fixation à l'ADN.

Si la phosphorylation semble être un processus pouvant activer un récepteur, elle peut aussi induire la fixation d'un récepteur sur son élément de réponse. En ce qui concerne les récepteurs orphelins, ce processus a été décrit pour Nur77, un récepteur du groupe NGFIB. Nur77 possède une sérine en position 354 dans son domaine C qui est capable d'être phosphorylée (**figure 32**). Lorsque cette sérine est phosphorylée, Nur77 n'est plus capable de se fixer sur son élément de réponse, le site NBRE (pour « NGFIB Responsive Element » ) (Davis et Lau, 1994). En revanche un traitement à l'ACTH (pour «adrénocorticotrophic hormone»), une hormone importante pour l'induction de la synthèse des glucocorticoïdes, induit la déphosphorylation de cette sérine et permet à Nur77 de se fixer sur un NBRE. De plus, le traitement à l'ACTH conduit à une hyperphosphorylation du domaine amino-terminal de Nur77, ce qui pourrait activer la capacité transactivatrice de ce récepteur (Davis et al, 1993; Davis et Lau, 1994; **figure 32**). La phosphorylation peut donc jouer un rôle dans la fixation d'un récepteur à sa cible ADN. On peut donc imaginer que les récepteurs orphelins peuvent directement se fixer à l'ADN et activer la transcription *via* la phosphorylation en absence de ligand.

En conclusion, la phosphorylation constitue un mécanisme capable de produire, de manière générale, les mêmes effets qu'un ligand: fixation à l'ADN, activation transcriptionnelle, fixation de co-activateurs.



**Figure 33:** La capacité de RXR à fixer l'acide rétinoïque 9-*cis* et à transactiver varie en fonction de son partenaire sur un DR5. (A) Formation de l'hétérodimère RXR-NGFI-B sur un DR5 qui augmente la transactivation médiée par RXR en présence de l'acide rétinoïque 9-*cis*. (B) Formation de l'hétérodimère RXR-RAR où RAR empêche la fixation de l'acide rétinoïque 9-*cis* sur RXR et le rend silencieux (D'après Leblanc et Stunnenberg, 1995).

## **4) Recherche du rôle biologique des récepteurs orphelins.**

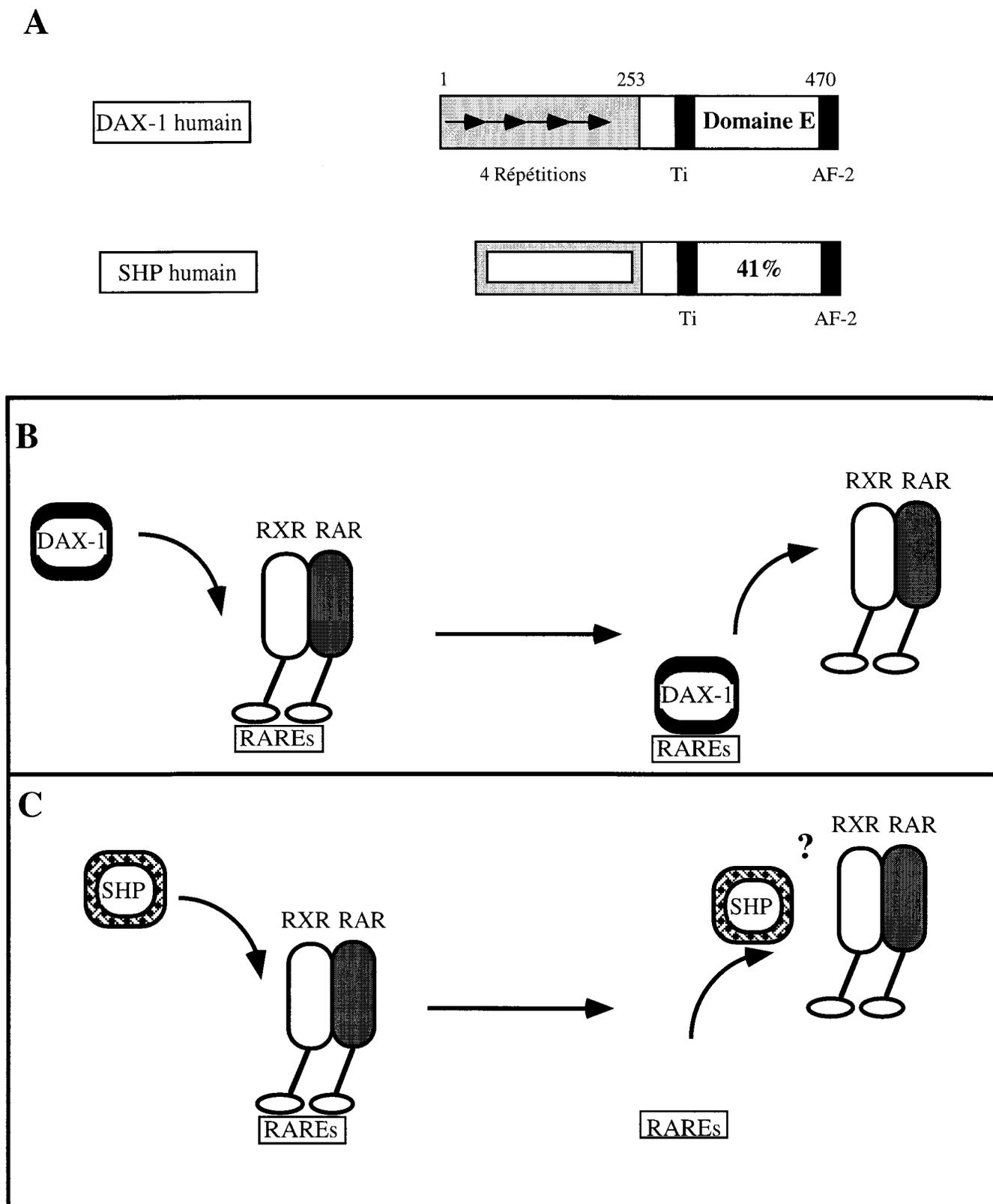
### **4.1) Intervention dans des voies de synthèses.**

Comme nous venons de le voir, les récepteurs orphelins peuvent être des activateurs de la transcription, ce qui suggère qu'ils peuvent réguler l'expression de gènes cibles. La recherche de gènes cibles et l'inhibition de la fonction de certains récepteurs orphelins par recombinaison homologue chez la souris ont permis de montrer que ces récepteurs pouvaient jouer un rôle biologique essentiel. C'est le cas de SF-1 qui est important dans la stéroïdogénèse et le développement des glandes surrénales et des appareils génitaux (pour revue Saez et Durand, 1994, Luo et al, 1995). Ce récepteur est capable d'activer la transcription de gènes codant des enzymes intervenant directement dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes dans la glande surrénale. De plus, chez la souris, l'inactivation du gène SF-1 produit chez les homozygotes une agénésie complète des surrénales et des gonades (Luo et al, 1995). Ceci montre bien que les récepteurs orphelins peuvent intervenir dans des mécanismes physiologiques importants. Le récepteur SF-1 est un des récepteurs orphelins les mieux décrits, quant à ses propriétés biologiques, il n'en reste pas moins que pour la majorité des récepteurs orphelins, la fonction biologique reste encore à déterminer.

### **4.2) Régulation de l'activité des récepteurs « classiques » par les récepteurs orphelins.**

Si les récepteurs orphelins sont capables de réguler l'expression de gènes cibles qui leurs sont spécifiques, comme nous venons juste de le voir, ils semblent aussi pouvoir réguler l'activité des récepteurs « classiques ». C'est le cas de récepteurs orphelins capables d'hétérodimériser avec RXR. La formation de ces hétérodimères peut alors potentialiser l'activité de RXR.

Afin d'illustrer ces effets modulateurs, prenons pour exemple le récepteur NGFIB. Celui-ci est capable d'hétérodimériser avec RXR sur l'élément de réponse DR5. Cette fixation est polarisée et nécessite RXR en position 5' et NGFIB en position 3' du site DR5 (**figure 33A**). Le récepteur NGFIB, ainsi fixé en absence de ligand, augmente l'activité de RXR en réponse à l'acide rétinoïque 9-*cis* qui est capable d'activer spécifiquement RXR (Perlmann et



**Figure 34:** DAX-1 et SHP deux récepteurs orphelins capables d'empêcher l'activité de l'hétérodimère RXR-RAR. (A) Structure de DAX-1 et de SHP qui ne possèdent qu'un domaine E et pas de domaine de fixation à l'ADN. Les domaines E de DAX-1 et SHP présentent entre eux 41% d'identité de séquence. (B) DAX-1 est capable de se fixer sur un RARE et d'empêcher par compétition la fixation de l'hétérodimère RXR-RAR. (C) SHP est capable d'hétérodimériser avec RXR-RAR ce qui inhibe la fixation de l'hétérodimère RXR-RAR sur son site RARE.

Jansson, 1995). Le récepteur NGFIB est donc capable de réguler positivement l'activation de RXR sur un DR5.

Cette potentialisation de RXR par NGFIB n'est pas observée avec des récepteurs classiques comme RAR. En effet RAR est aussi capable d'hétérodimériser avec RXR sur un DR5, mais contrairement à NGFIB, RAR empêche la fixation de l'acide rétinoïque 9-*cis* sur RXR (**figure 33B**). Ceci a pour conséquence majeure l'inactivité de RXR qui devient alors un partenaire silencieux (Perlmann et Jansson, 1995; revue dans Mangelsdorf et Evans, 1995b; **figures 33A et B**). La simple compétition entre NGFIB et RAR pour l'occupation du même élément de réponse conduit donc (i) soit à un RXR capable de fixer l'acide rétinoïque 9-*cis* et donc actif avec NGFIB comme partenaire (ii) soit à un récepteur RXR incapable de fixer son ligand et donc silencieux avec RAR. Les récepteurs orphelins peuvent donc jouer un rôle important dans la réponse à un signal hormonal sans être pour autant reconnus par un ligand. Ces effets allostériques complexes entre deux monomères de récepteurs qui interagissent sur un élément de réponse complexe comme une répétition directe font actuellement l'objet de nombreuses investigations (Schulman et al, 1997).

#### **4.3) DAX-1 et SHP des récepteurs orphelins sans domaine C : un moyen de réguler négativement l'activité de l'hétérodimère RXR- RAR.**

Le domaine C est toujours apparu comme la véritable signature de la famille des récepteurs nucléaires jusqu'à la découverte de DAX-1 (Zanaria et al, 1994).

En effet, contrairement aux récepteurs nucléaires classiques, DAX-1 ne possède pas de domaine C (Zanaria et al, 1994; **figure 34A**). Pourtant l'absence de ce domaine ne l'empêche pas de se fixer à l'ADN comme il est capable de le faire sur un HRE. Plus précisément il est capable de se fixer sur le même élément de réponse que l'hétérodimère RXR-RAR, à savoir un DR5. Sur ce site, DAX-1 est incapable d'hétérodimériser avec RAR $\alpha$  ou RXR $\alpha$  mais il peut, par sa fixation, empêcher celle de l'hétérodimère RXR-RAR.

DAX-1 supprime alors de cette manière l'activité transcriptionnelle de ces deux récepteurs (Zanaria et al, 1994; **figure 34B**). Ceci montre que les récepteurs orphelins peuvent empêcher la fixation de récepteurs classiques sur leur HRE et donc en conséquence inhiber leur activité.

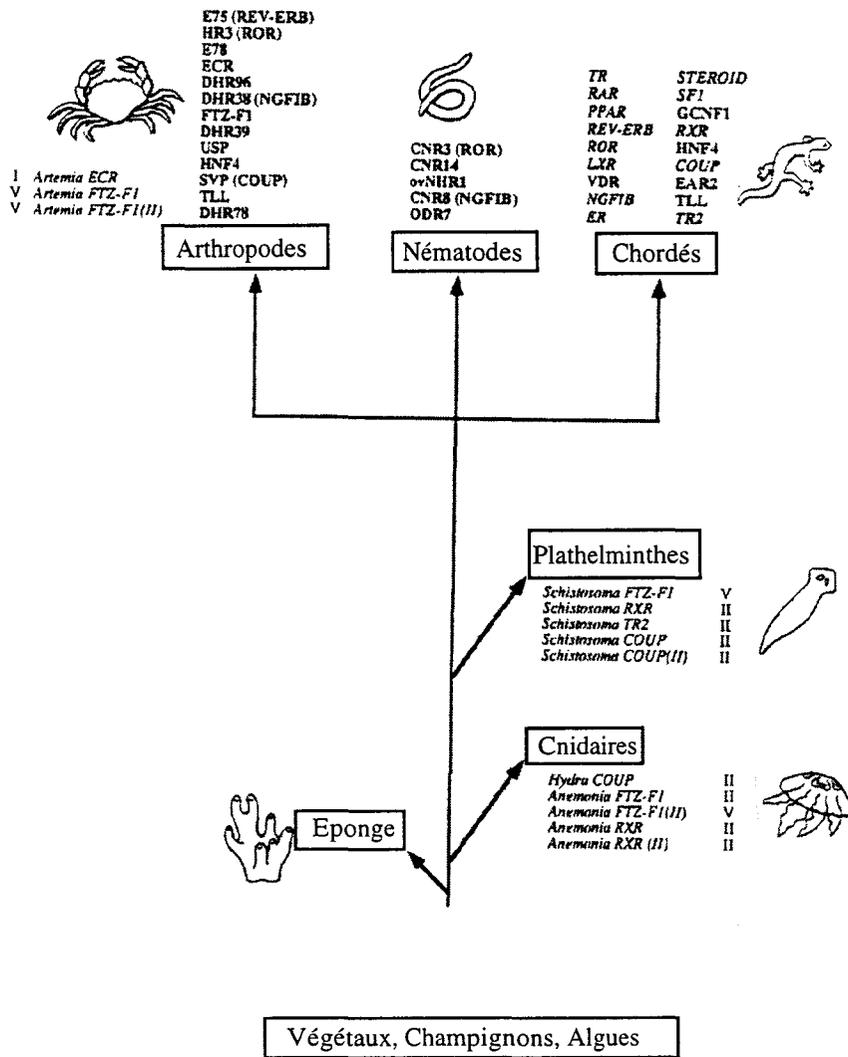
Récemment SHP (pour « short heterodimer partner »), un autre récepteur nucléaire orphelin proche de DAX-1 et ne possédant pas, comme lui, de domaine C, a été mis en évidence (Seol et al, 1996; **figure 34A**). Contrairement à DAX-1, SHP ne se fixe pas sur un DR5 mais est capable d'hétérodimériser avec RAR et RXR. En revanche, si SHP semble agir comme RXR en interagissant avec plusieurs récepteurs nucléaires, il inhibe la fixation de l'hétérodimère RXR-RAR sur un DR5 (Seol et al, 1996; **figure 34C**). Les récepteurs orphelins peuvent donc aussi réguler l'activité de récepteurs classiques en hétérodimérisant avec eux, les empêchant ainsi de se fixer sur leur élément de réponse.

En conclusion, ces deux récepteurs orphelins qui ne possèdent pas le domaine le plus conservé des récepteurs nucléaires, peuvent tout de même, constituer une autre voie de régulation de RXR *via* leur fixation sur l'élément de réponse ou leur hétérodimérisation avec RXR et RAR. Les différences entre les modes d'action de DAX-1 et SHP restent, à ce jour, inexplicables.

## 5) L'oeuf ou la poule?

L'existence de récepteurs orphelins et classiques capables d'activer la transcription en absence et en présence de ligands nous pousse à nous questionner sur leurs origines. Plus précisément les récepteurs orphelins sont-ils les ancêtres des récepteurs classiques ou inversement? En d'autres termes, la capacité à fixer un ligand a-t-elle été gagnée ou perdue au cours de l'évolution? Un certain nombre d'études semblent suggérer que la capacité à fixer le ligand s'est mise en place au cours de l'évolution et que les récepteurs orphelins sont les ancêtres des récepteurs reconnus par un ligand.

En effet certains récepteurs orphelins ont été mis en évidence chez des organismes qui ont divergé très précocement, ce qui n'est pas le cas pour des récepteurs classiques. Ainsi *odr-7* a été isolé chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. De plus, notre équipe a identifié des récepteurs orphelins chez deux groupes de métazoaires précoces: les Cnidaires et les

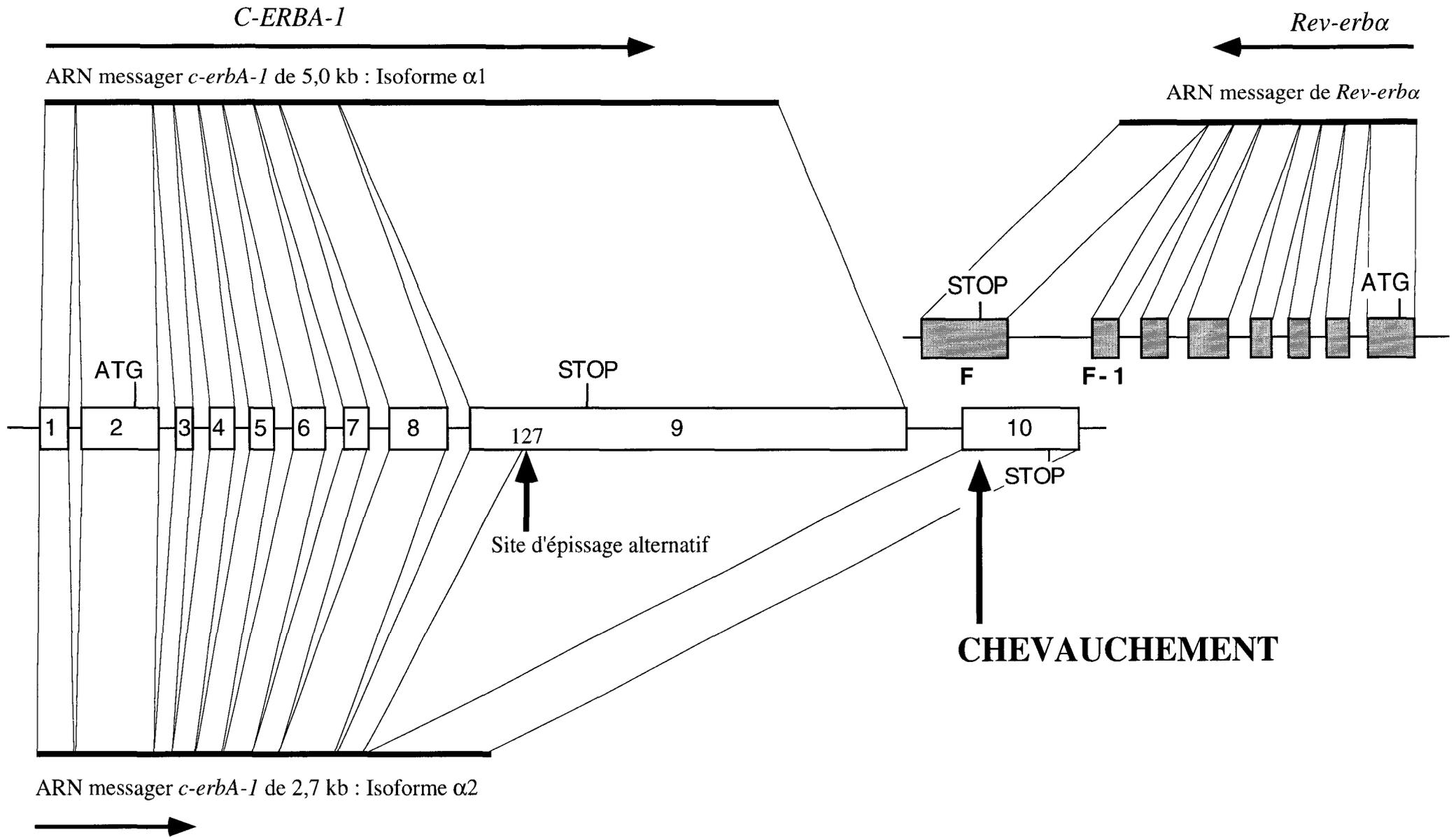


**Figure 35:** Arbre évolutif simplifiée du règne animal indiquant les principaux récepteurs nucléaires trouvés dans les différents embranchements ( d'après Escriva *et al*, 1997)

Platyhelminthes (**figure 35**). En ce qui concerne les Cnidaires, les récepteurs orphelins COUP et FTZ-F1 ont été respectivement identifiés chez l'hydre (*hydra vulgaris*) et chez l'anémone de mer (*Anemonia sulcata*). De plus chez les Platyhelminthes, FTZ-F1, RXR et COUP ont été mis en évidence chez le schistosome (*Schistosoma mansoni*). Il est aussi intéressant de signaler qu'aucun récepteur classique ne semble posséder un homologue chez les arthropodes, à l'exception de l'homologue de RXR (USP). En revanche, certains récepteurs orphelins comme Rev-erb $\alpha$  et NGFIB possèdent leur homologue chez les arthropodes à savoir E75 et DHR38 respectivement (Escriva et al, 1997; revue dans Segraves, 1991). Ceci semble donc suggérer des origines plus anciennes pour les récepteurs orphelins comparées aux récepteurs classiques.

Enfin, si l'on considère la mise en place de la capacité des récepteurs à fixer un ligand, il est intéressant de revenir sur le cas de RXR et de USP. L'homologue de drosophile de RXR, à savoir USP, est incapable de fixer l'acide rétinoïque 9-*cis* et pourrait donc être un récepteur orphelin chez les arthropodes (revue dans Segraves, 1991). Ceci peut conduire à émettre deux hypothèses: (i) la première qui est de penser que la capacité à fixer un ligand par les récepteurs a été acquise au cours de l'évolution chez les ancêtres des vertébrés et que donc chez les arthropodes celle-ci n'existe pas encore; (ii) la deuxième qui est de dire que cette capacité à fixer l'acide rétinoïque 9-*cis* a été perdue chez les insectes. Cette dernière hypothèse semble se confirmer chez les insectes. En effet, l'homologue de RXR de tique qui vient d'être isolé, est aussi incapable de fixer l'acide rétinoïque 9-*cis* (Guo et al, soumi).

En conclusion, pour répondre à la question initialement posée, les récepteurs orphelins pourraient donc être les ancêtres des récepteurs nucléaires classiques. De plus, le fait que la capacité transactivatrice de récepteurs classiques et orphelins puissent être mise en route en absence de ligand *via* la phosphorylation, nous conforte dans cette hypothèse. En effet, dans ce cas, la capacité de ces récepteurs à activer la transcription et donc à réguler l'expression de gènes cibles est conservée. Ceci suggère que ces récepteurs orphelins pouvaient alors médier une activité biologique, en absence de ligand, chez des organismes qui ont divergé très précocement.



**Figure 36:** Représentation schématique du chevauchement entre *c-erbA-1* et *Rev-erb $\alpha$* . Le chevauchement s'effectue sur 1kpb en comptant les régions non codantes entre l'exon 10 de *c-erbA-1* et l'exon F de *Rev-erb $\alpha$* . *c-erbA-1* code deux isoformes du récepteur des hormones thyroïdiennes TR $\alpha 1$  et TR $\alpha 2$  via un site d'épissage alternatif situé dans l'exon 9

## IV Présentation des récepteurs orphelins Rev-erb et ERR.

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a porté sur deux groupes de récepteurs orphelins: les Rev-erb et les ERR. Il nous a donc semblé important de les présenter plus en détail.

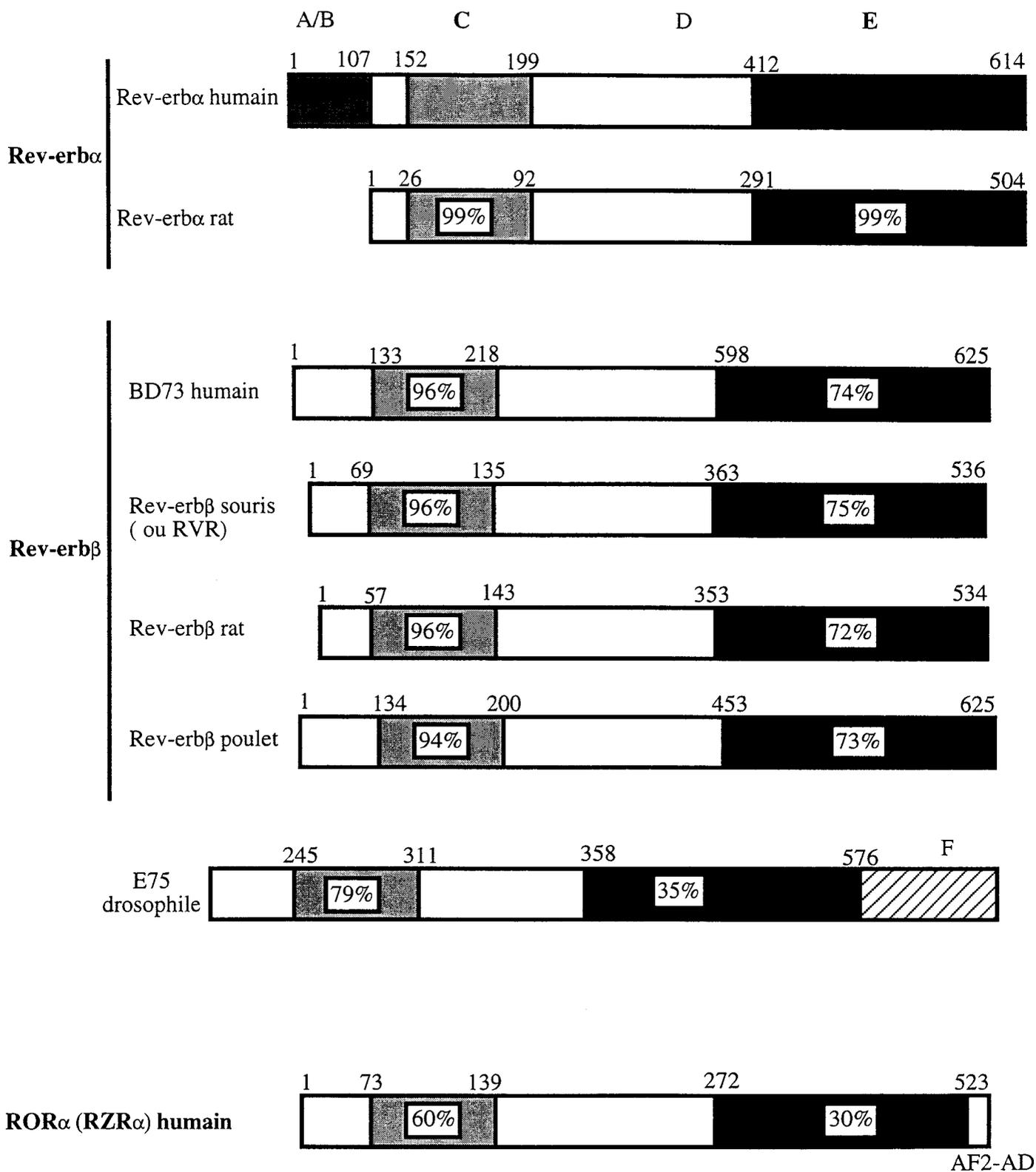
### 1) Les groupes Rev-erb et ROR.

#### 1.1) Le chevauchement c-erbA-1/Rev-erb $\alpha$ .

Rev-erb $\alpha$  a été le premier des récepteurs de ce groupe à être identifié. C'est un récepteur orphelin et il appartient à la sous-famille I qui comprend, entre autres, les récepteurs TR, RAR, PPAR, et LXR (Laudet, 1997). Rev-erb $\alpha$  a été découvert fortuitement car chez l'homme et le rat, il chevauche partiellement le gène c-erbA-1 qui code le récepteur de type  $\alpha$  des hormones thyroïdiennes (Miyajima et al, 1989; Lazar et al, 1989; **figure 36**). Ce chevauchement se fait sur plus de 1kpb en comptant les régions non codantes au niveau de l'exon 10 de c-erbA-1 et de l'exon F de Rev-erb $\alpha$  (Laudet et al, 1991; **figure 36**).

Le gène c-erbA-1 qui contient 10 exons, présente des caractéristiques intéressantes. En effet il est capable, suite à un épissage alternatif situé au niveau de l'exon 9, de coder deux isoformes, appelées  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  qui ont des fonctions opposées. L'isoforme  $\alpha 1$  est codée par les exons de 1 à 9 et contient 410 acides aminés. C'est un récepteur classique des hormones thyroïdiennes qui se fixe spécifiquement à l'ADN sur son élément de réponse TRE (pour « Thyroid hormone Responsive Element »), réprime la transcription en absence de ligand et l'active fortement en sa présence. L'isoforme  $\alpha 2$ , qui comporte 490 acides aminés, correspond aux exons 1 à 8 et aux 127 premiers nucléotides de l'exon 9 où un site d'épissage alternatif est reconnu. Il y a alors jonction à l'exon 10. Ainsi l'isoforme  $\alpha 2$  n'est plus capable de fixer le ligand car la partie carboxy-terminale du domaine E a disparu et a été remplacé par les acides aminés codés par l'exon 10. En conséquence  $\alpha 2$  agit comme un régulateur négatif dominant de  $\alpha 1$ :  $\alpha 2$  se fixe aux mêmes sites que  $\alpha 1$ , mais réprime en permanence la transcription, comme  $\alpha 1$  en absence de ligand (Izumo et Mahdavi, 1988; Koenig et al, 1989).

La deuxième caractéristique de ce locus concerne justement Rev-erb $\alpha$ . En effet, l'exon 10 du gène c-erbA-1 qui code la partie spécifique du transcrit  $\alpha 2$  est justement celui qui est chevauché par l'exon F de Rev-erb $\alpha$ . Ainsi, à ce niveau, un brin de la double hélice d'ADN



**Figure 37:** Représentation des identités de séquence des domaines C et E entre les différents membres de la famille Rev-erb. Ce groupe est constitué de deux gènes Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ . Rev-erb $\beta$  a été cloné par plusieurs équipes au même moment ce qui explique la diversité des noms attribués à ce gène. Les gènes les plus proches des Rev-erb sont les gènes codant les récepteurs orphelins ROR également appelés RZR. Ils sont au nombre de trois et nous n'avons représenté ici que ROR $\alpha$  afin de montrer les identités de séquences entre un des membres du groupe ROR/RZR et les Rev-erb.

codé  $\alpha 2$  tandis que l'autre brin code le produit de Rev-erb $\alpha$ . Rev-erb $\alpha$  a donc été identifié *via* son appartenance à cette structure inhabituelle. De telles structures de gènes chevauchants étaient rares à l'époque et ce locus qui contient deux gènes appartenant à la même famille était unique (revue dans Bonnelye et Laudet, 1994). Elle a donc suscité un intérêt considérable.

Nous avons d'ailleurs montré que cette structure était conservée chez les marsupiaux. Elle doit donc être présente chez tous les mammifères ( Bonnelye et al, résultats non publiés). Par contre, elle ne semble pas présente chez le poulet bien que l'on ne puisse pas exclure que les deux gènes c-erbA-1 et Rev-erb $\alpha$  soient proches l'un de l'autre chez cette espèce.

### **1.2) Présentation du groupe de gènes Rev-erb/ROR.**

Il existe au moins deux gènes Rev-erb chez les mammifères: Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ . Le gène Rev-erb $\alpha$  a été isolé chez les mammifères (Miyajima et al, 1989; Lazar et al, 1989; **figure 37**). Plus récemment Rev-erb $\beta$  a été identifié chez les mammifères et le poulet (Retnakaran et al, 1994; Dumas et al, 1994; Enmark et al, 1994; Forman et al, 1994; Bonnelye et al, 1994). Ces deux gènes forment avec E75, un homologue chez la drosophile, un groupe de gènes codant les récepteurs orphelins de type Rev-erb (Segraves et al, 1990). Les récepteurs du groupe Rev-erb se caractérisent par un pourcentage d'identité oscillant entre 97% pour le domaine C et 68% pour le domaine E. Caractéristique intéressante, ils ne possèdent pas de domaines AF2-AD dans leur domaine E (**figure 37**).

Enfin, un groupe de 3 gènes proches des Rev-erb appelé ROR ou RZR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (ROR pour « RAR related Orphan Receptor ») a été identifié (Giguère et al, 1994; Carlberg et al, 1994; Hirose et al, 1994). Ces récepteurs ROR/RZR sont des récepteurs orphelins comme les récepteurs du groupe Rev-erb et nous verrons plus tard qu'ils peuvent se fixer sur le même élément de réponse. Les récepteurs du groupe Rev-erb et ROR/RZR présentent une identité d'environ 60% pour le domaine C et de 30% pour le domaine E. De plus, contrairement aux récepteurs du groupe Rev-erb, les ROR/RZR possèdent un domaine AF2-AD.

### **1.3) Capacité à fixer l'ADN des récepteurs Rev-erb/ROR.**

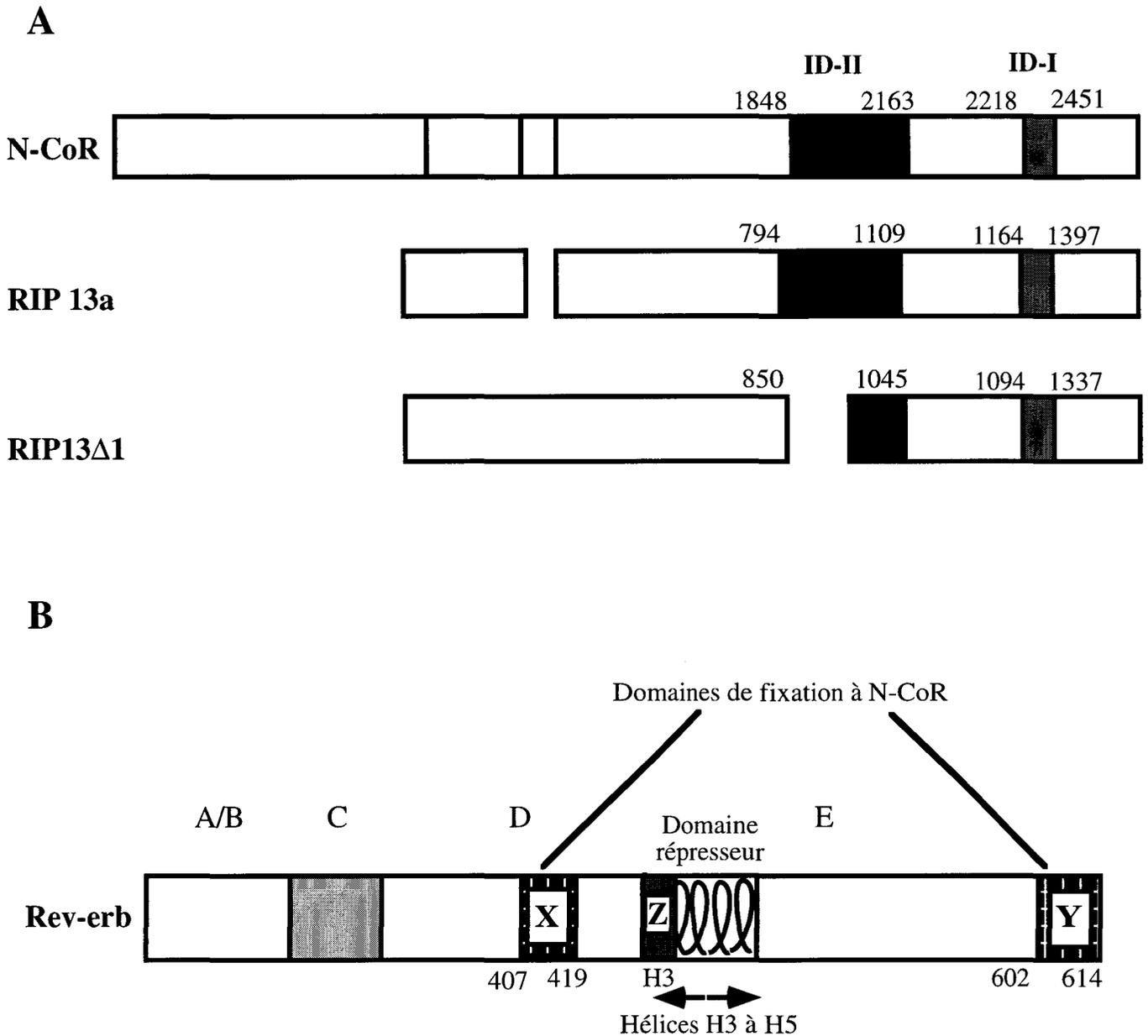
En ce qui concerne la capacité à fixer l'ADN, Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  sont très semblables. Ces récepteurs sont capables de se fixer sur un élément de réponse appelé RevRE (pour « Rev-erb Responsive Element ») caractérisé par un élément AGGTCA unique, précédé d'une région riche en bases A/T dont la séquence consensus est A/TAA/TNT. Sur ce site les protéines Rev-erb sont capables de se fixer sous forme de monomères (Harding et Lazar, 1993; Forman et al, 1994, Retnakaran et al, 1994). Les récepteurs de type ROR/RZR, sont également capables de se fixer sous forme de monomères sur le même élément RevRE (Forman et al, 1994).

Les récepteurs Rev-erb sont également capables de se fixer sur un élément de réponse appelé RevDR2 qui est constitué de deux répétitions directes AGGTCA séparées par deux bases (un C et un T). Ce site contient, en plus, la séquence riche en A/T en amont du site 5' d'ou son nom de RevDR2. Sur cet élément de réponse le récepteur Rev-erb $\alpha$  est capable de former un homodimère. Ceci a été montré sur un site RevDR2 parfait mais aussi sur un site RevDR2 naturel qui a été mis en évidence dans le promoteur de Rev-erb $\alpha$  humain (Harding et Lazar, 1995; Adelmant et al, 1996).

### **1.4) Activité transcriptionnelle des récepteurs Rev-erb/ROR.**

#### **1.4.1) Les récepteurs Rev-erb sont des répresseurs de la transcription.**

Les récepteurs de type Rev-erb sont donc capables de se fixer sur un RevRE et sur un RevDR2 respectivement sous forme de monomère et d'homodimère. Les premiers travaux avaient montré que Rev-erb $\alpha$  pouvait agir comme activateur de la transcription sur le site RevRE mais ces résultats n'ont jamais été reproduits jusqu'à présent (Harding et Lazar, 1993). En fait les Rev-erb se comportent comme des répresseurs transcriptionnels qu'ils soient fixés sous forme de monomère sur un RevRE ou sous forme d'homodimères sur un RevDR2. Ainsi, sur l'élément RevRE, Rev-erb $\alpha$  et  $\beta$  se comportent tous les deux comme des répresseurs de la transcription basale mais aussi d'une activité transcriptionnelle médiée par ROR/RZR (Retnakaran et al, 1994, Forman et al, 1994). Ainsi si on introduit dans une cellule, contenant un vecteur rapporteur lié à un RevRE et un vecteur d'expression ROR, des quantités croissantes



**Figure 38:** Interaction des récepteurs Rev-erb avec des co-répresseurs: (A) Localisation des domaines d'interaction ID-II et ID-I (pour "Intracation Domain") de N-CoR et de deux variants de N-CoR, RIP13a et RIP13Δ1, avec Rev-erb. (B) Représentation des trois domaines X, Y et Z des Rev-erb qui interagissent avec N-CoR, RIP13a et RIP13Δ1. En ce qui concerne Rev-erb $\beta$ , le domaine X n'est pas nécessaire pour l'interaction avec ces co-répresseurs. En revanche, les domaines Y et Z lui sont indispensables. Pour Rev-erb $\alpha$  les trois domaines X, Y et Z sont nécessaires pour son interaction avec N-CoR et RIP13a mais le domaine X ne semble pas intervenir dans l'interaction avec RIP13Δ1 (D'après Downes et al, 1996).

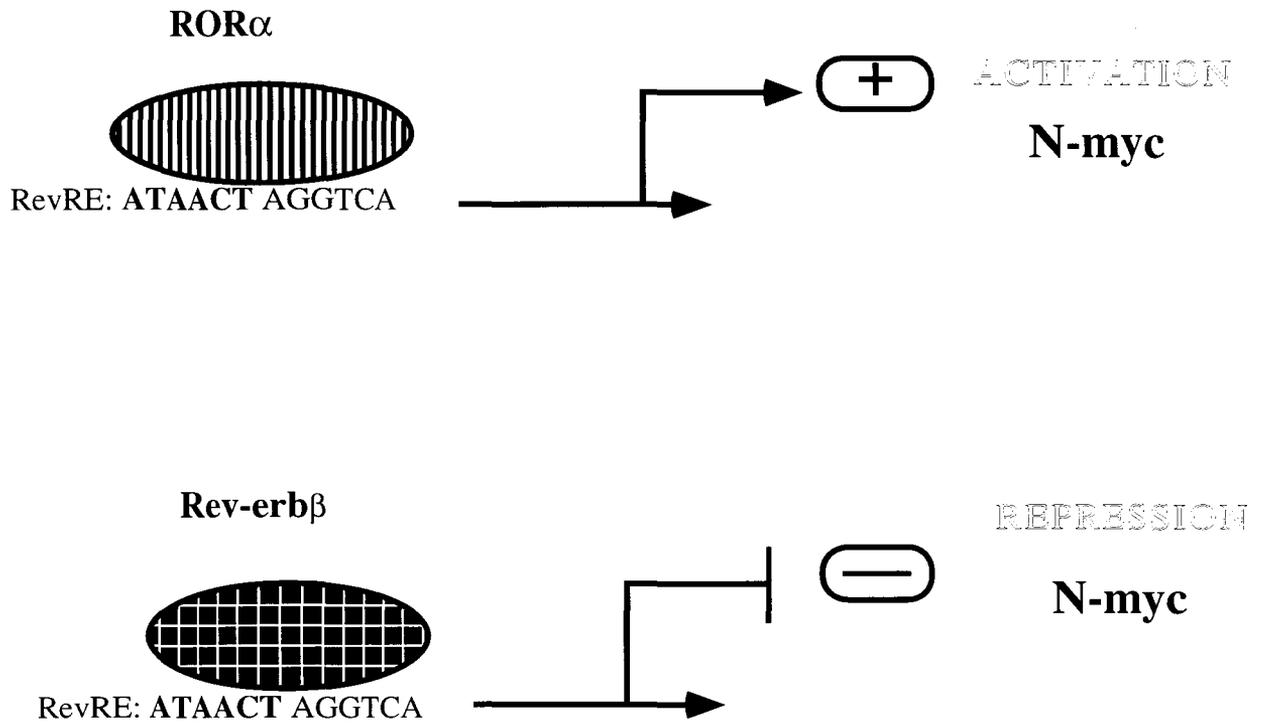
d'un vecteur d'expression Rev-erb, on observe une diminution de plus en plus grande de la transcription (Retnakaran et al, 1994, Forman et al, 1994).

Les Rev-erb sont également des répresseurs sur l'élément RevDR2 lorsqu'ils s'y fixent sous forme de dimères. Ceci est vrai sur un site synthétique parfait ou sur le site RevDR2 contenu dans le promoteur humain de Rev-erb $\alpha$  qui est donc réprimé par son propre produit (Harding et Lazar, 1995; Adelmant et al, 1996).

Une polémique existe cependant sur l'intensité relative de la répression médiée par les Rev-erb sur les éléments: RevRE et RevDR2. L'équipe de Mitch Lazar pense que les Rev-erb ne répriment activement la transcription que sous forme d'homodimères sur un RevDR2 (Harding et Lazar, 1995). Par contre notre équipe a démontré un action répressive de Rev-erb $\alpha$  fixé sous forme de monomère comme de dimère. Ainsi lorsqu'on mute l'élément 3' du site RevDR2 du promoteur du gène Rev-erb $\alpha$  humain (le transformant ainsi en un RevRE), on observe tout de même une forte répression de ce promoteur par Rev-erb $\alpha$ , bien que plus faible qu'avec le site RevDR2 (Adelmant et al, 1996). Les raisons de ces divergences ne sont pas encore claires.

#### 1.4.2) Interaction des récepteurs Rev-erb avec des co-répresseurs.

Puisque les récepteurs Rev-erb sont des répresseurs transcriptionnels, il était intéressant de comprendre comment cette répression pouvait être conduite. Récemment, cette activité répressive de récepteurs Rev-erb a été montrée médiée par la fixation sur ces récepteurs, de molécule de co-répresseurs. Ainsi les équipes de Mitch Lazar et de Georges Muscat ont montré une interaction entre les Rev-erb et N-CoR ou RIP13a et RIP13 $\Delta$ 1, deux variants de N-CoR (Downes et al, 1996; Zamir et al, 1996; Burke et al, 1997). La recherche des régions permettant l'interaction entre N-CoR et les récepteurs Rev-erb a permis d'identifier dans les Rev-erb, trois domaines intervenant dans cette interaction: les domaines X, Y et Z localisés respectivement dans le domaine D, dans la région carboxy-terminale du domaine E et dans l'hélice H3, au début du domaine E (Downes et al, 1996; Burke et al, 1997; **figure 38B**).



**Figure 39:** Régulation de la transcription du gène *N-myc* par ROR $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ . ROR $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  sont capables de se fixer sur le même élément de réponse (RevRE). Sur cet élément ROR $\alpha$  active la transcription de *N-myc* alors que Rev-erb $\beta$  la réprime.

Pour ce qui est des co-répresseurs N-CoR, RIP13a et RIP13 $\Delta$ 1, deux domaines appelés ID-I et ID-II intervenant dans l'interaction des récepteurs Rev-erb ont aussi été identifiés, (Downes et al, 1996; Burke et al, 1997) (**figure 38A**).

L'étude des interactions entre ces co-répresseurs et les récepteurs Rev-erb a permis de montrer qu'il y avait des interfaces différentes entre Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ . Ainsi le domaine X est nécessaire pour l'interaction de Rev-erb $\alpha$  avec N-CoR et RIP13a mais pas avec RIP13 $\Delta$ 1. Ceci n'est pas le cas pour Rev-erb $\beta$  qui est capable d'interagir avec ces co-répresseurs uniquement *via* ces domaines Y et Z (Burke et al, 1997). Ceci montre que les co-répresseurs peuvent se fixer différemment sur Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ , ce qui pourrait entraîner une discrimination entre les deux récepteurs. Ceci constituerait donc pour la première fois une différence fonctionnelle entre Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  qui pourrait entraîner des actions différentes de ces récepteurs vis à vis de leurs gènes cibles.

#### 1.4.3) Action antagoniste des récepteurs Rev-erb et ROR.

Si les récepteurs Rev-erb sont des répresseurs, les récepteurs ROR se comportent comme des activateurs de la transcription. Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs Rev-erb et ROR sont capables de se fixer à la même séquence cible à savoir un RevRE, ce qui suggère une compétition et des actions antagonistes des ces récepteurs. Ceci a effectivement été montré *in vitro* sur un élément RevRE synthétique cloné en amont d'un gène indicateur (Forman et al, 1994). Plus récemment il a été montré que ce modèle était vrai dans le cas du gène *N-myc* (Dussault et Giguère, 1997; **figure 39**). Ce gène possède dans son intron 1, un site de reconnaissance de type RevRE qui est reconnu par ROR $\alpha$  et Rev-erb $\beta$ . Sur cet élément de réponse ROR $\alpha$  active la transcription alors que Rev-erb $\beta$  la réprime. Ces effets opposés semblent avoir des conséquences physiologiques importantes. Dans un test de transformation cellulaire *in vitro* dans des cellules de carcinome embryonnaire P19, la surexpression de ROR $\alpha$  conduit à la formation de deux fois plus de foyers de cellules transformées que pour les cellules contrôles. Inversement, la surexpression de Rev-erb $\beta$  n'entraîne pas la formation de foyers supplémentaires par rapport au contrôle. De plus la mutation du site RevRE induit l'augmentation de l'oncogénicité de *N-myc*, ce qui conduit à la

v-erbA:	K V E C P T E L S P . . . . . Q E V
rTR $\alpha$ :	K V E C P T E L F P P L F L E V F E D Q E V
hRAR $\alpha$ :	K M E I P G S L M P P L I Q E M L E N S E G
Rev-erb $\alpha$ :	R V D A Q
Rev-erb $\beta$ :	K V H P
ROR $\alpha$ :	K A I Y P D I V R L H F P P L Y K E L F T
COUP-TFA:	R L Q D K K L R Q Q L P P L L S E I W D V H

**Figure 40:** Séquence des domaines AF2-AD de certains récepteurs. Ce domaine est localisé dans la partie carboxy-terminale du domaine E. Comme on peut le constater, les Rev-erb ne possèdent pas de domaine AF2-AD contrairement à ROR. v-erbA qui n'est pas capable d'activer la transcription présente une version tronquée de ce domaine AF2-AD. En revanche le récepteur COUP-TF possède un domaine AF2-AD et est un répresseur de la transcription. Mais le domaine AF2-AD de COUP présente un certain nombre de mutations qui le rend incapable de fixer des co-activateurs (Durand et al, 1994).

formation de quatre fois plus de foyers. Ceci suggère donc qu'à l'état basal Rev-erb réprime effectivement la transcription de ce gène. Il apparaît donc que cette régulation antagoniste médiée par Rev-erb $\beta$  et ROR $\alpha$  est importante pour limiter les effets proliférateurs de N-*myc* qui peuvent être à l'origine de la formation de foyers cancéreux (Dussault et Giguère, 1997).

#### 1.4.4) Absence du domaine AF2-AD: Comment activer les récepteurs Rev-erb?

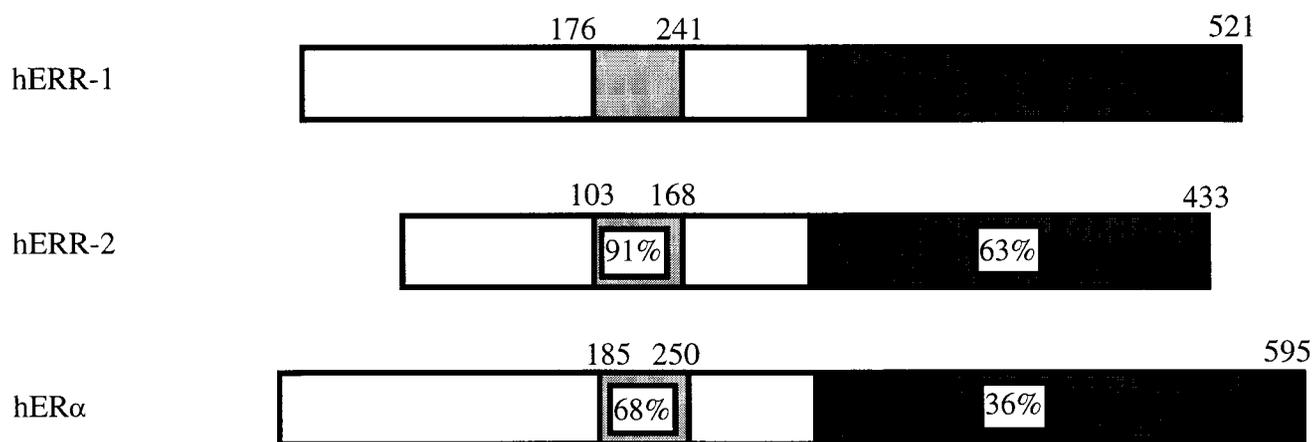
Comme nous l'avons décrit auparavant, le domaine AF2-AD intervient dans la fermeture de la poche hydrophobe reconnue par les ligands ainsi que dans l'interaction des récepteurs nucléaires avec les co-activateurs (Renaud et al, 1995; Wagner et al, 1995; revue dans Horwitz et al, 1996). L'absence de ce domaine AF2-AD chez les récepteurs Rev-erb pourrait suggérer qu'ils ne puissent pas fixer de co-activateurs et donc ne pas pouvoir activer la transcription ce qui est en accord avec leur rôle de répresseur (**figure 40**). Ceci pourrait aussi expliquer le fait que les récepteurs les plus proches des Rev-erb, à savoir les récepteurs ROR, soient des activateurs. En effet, les récepteurs ROR possèdent un domaine AF2-AD ce qui constitue la différence majeure entre eux et les Rev-erb. Mais il n'est cependant pas impossible que les récepteurs Rev-erb puissent fixer des co-activateurs. En effet, certains co-activateurs comme TRIP1 peuvent se fixer ailleurs que sur le domaine AF2-AD, comme par exemple sur le domaine AF-1 (revue dans Horwitz et al, 1996).

Enfin les Rev-erb pourraient être régulés par phosphorylation. Il est ainsi frappant de constater que le domaine A/B des Rev-erb possède une cinquantaine de résidus sérine ou thréonine répartis et même une série de douze sérines successives qui peuvent être des cibles d'événements de phosphorylation. Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation peut constituer un moyen d'activation des récepteurs et permettre la fixation de co-activateurs. En conclusion, l'absence de domaine AF2-AD pour les récepteurs Rev-erb suggère que ces récepteurs sont des répresseurs constitutifs, mais l'existence d'autres processus ne nécessitant pas ce domaine AF2-AD peut aussi permettre de supposer que ces récepteurs peuvent aussi se comporter comme des activateurs.

### 1.5) Rôle biologique des récepteurs Rev-erb.

Deux rôles potentiels des récepteurs Rev-erb ont été mis en évidence jusqu'à présent. Plus précisément, il a été montré que Rev-erb $\alpha$  pouvait intervenir dans la différenciation adipocytaire. Une forte augmentation de l'expression de Rev-erb $\alpha$  a été détectée lors de la différenciation des adipocytes dans le modèle des cellules 3T3-L1 (Chawla et Lazar, 1993). Ainsi, on observe une quantité dix fois plus importante d'ARNm de Rev-erb $\alpha$  dans les adipocytes par rapport aux préadipocytes. De plus, un traitement à l'acide rétinoïque, connu pour inhiber la différenciation adipocytaire, inhibe l'expression de Rev-erb $\alpha$ . Il semblerait donc que ce récepteur joue un rôle dans la différenciation adipocytaire, hélas ces résultats n'ont jamais été reproduits par une autre équipe jusqu'à présent.

Plus récemment, un autre rôle biologique des récepteurs Rev-erb a été mis en évidence et concerne la différenciation musculaire. Contrairement au rôle joué par Rev-erb $\alpha$  dans la différenciation adipocytaire, ces récepteurs semblent plutôt intervenir dans le maintien des cellules musculaires dans un état non différencié (Downes et al, 1995; Burke et al, 1996). En effet, Rev-erb $\alpha$  comme Rev-erb $\beta$  sont essentiellement exprimés dans les myoblastes et leur niveau d'expression diminue énormément lorsque ces cellules se différencient en myotubes. Le rôle des récepteurs Rev-erb dans l'inhibition de la différenciation musculaire a été confirmé par des expériences de surexpression de ces récepteurs dans des cellules myoblastiques C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. De fait, dans ces cellules, la surexpression de Rev-erb $\alpha$  ou de Rev-erb $\beta$ , respectivement, abolit radicalement l'expression de marqueurs de différenciation musculaire comme myoD et la myogénine, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la différenciation musculaire. De plus la surexpression des Rev-erb inhibe aussi l'expression de la chaîne  $\alpha$  de l'actine qui intervient directement dans la formation des fibres musculaires (Downes et al, 1995; Burke et al, 1996). En conclusion, les récepteurs Rev-erb seraient importants pour des processus de différenciation cellulaire bien que leurs rôles semblent être antagonistes dans différents systèmes. En effet, Rev-erb $\alpha$  semble activer la différenciation adipocytaire mais inhiber la différenciation musculaire.



**Figure 41:** Comparaison de séquences des domaines C et E de ERR-1, ERR-2 et du récepteur des oestrogènes ER $\alpha$ .

## 2) Les récepteurs orphelins ERR-1 et ERR-2.

### 2.1 Mécanisme d'action.

#### 2.1.1) Identification et expression.

Ces deux gènes ont été identifiés en criblant plusieurs banques d'ADNc humain, dans des conditions relâchées, avec une sonde correspondant à la région codant le domaine C du récepteur des oestrogènes ER (Giguère et al, 1988). Ces deux récepteurs contiennent les domaines caractéristiques des récepteurs nucléaires. Le domaine C de ERR-1 présente 91% d'identité avec celui de ERR-2, et 68% avec celui de ER humain (**figure 41**). Pour le domaine E on observe une identité de 63% entre ERR-1 et ERR-2 et 36% ERR-1 et ER humain. Caractéristique importante, ERR-1 et ERR-2, qui sont tous les deux des récepteurs nucléaires orphelins, possèdent un domaine AF2-AD dont la séquence est très proche de celle de ER. Ceci pourrait suggérer que ces deux récepteurs peuvent fixer des co-activateurs et activer la transcription comme ER. Ainsi les co-activateurs RIP160 et TIF1 se fixent sur ER par l'intermédiaire de ce domaine, ce qui sera peut-être aussi le cas pour ERR-1 et ERR-2 (Le Douarin et al, 1995; Halachmi et al, 1994).

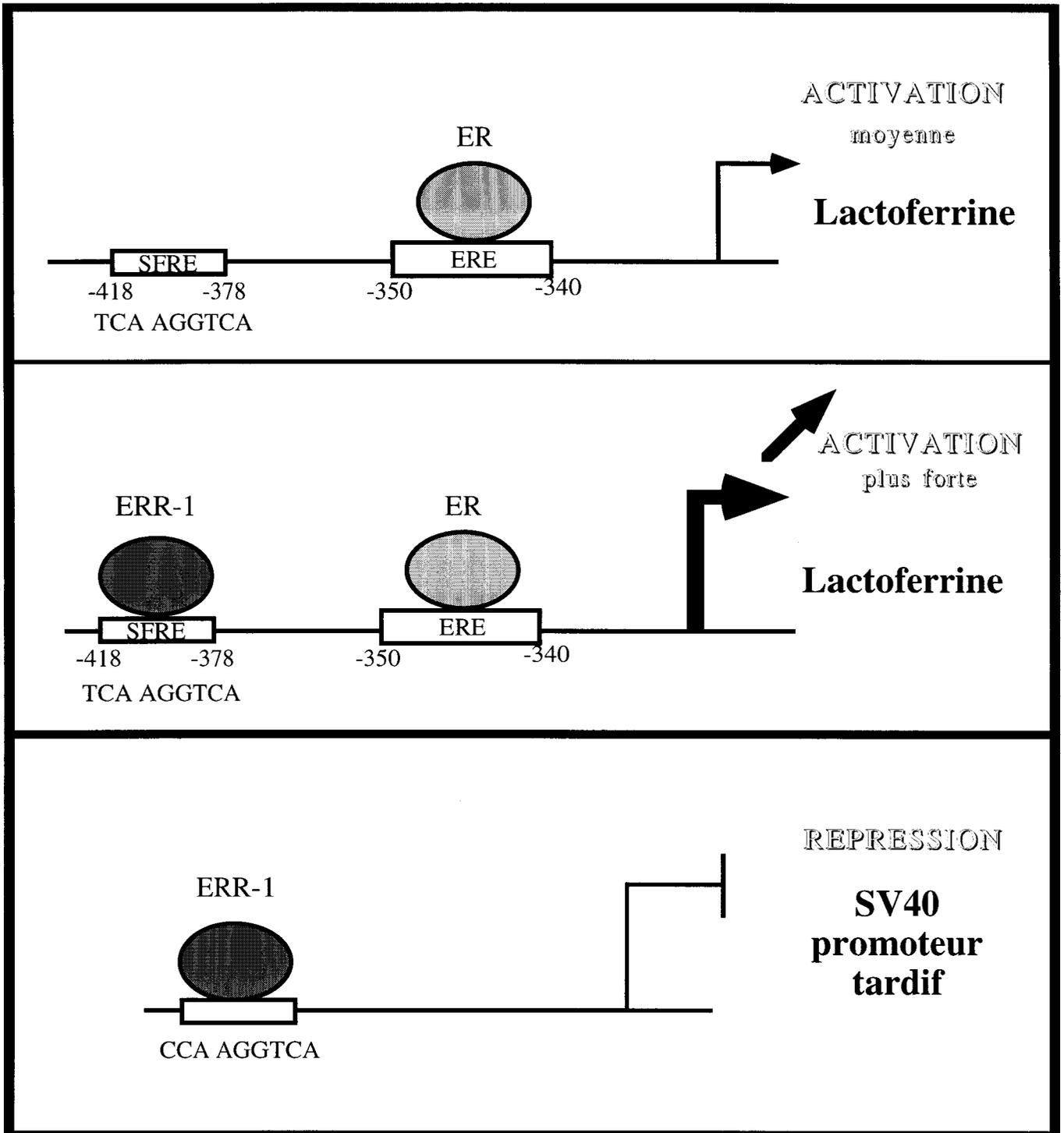
En étudiant par « northern blot » l'expression des ARNm de ERR-1, l'équipe de Evans a montré que ce gène était essentiellement exprimé chez l'adulte dans le système nerveux, le coeur, l'intestin et le rein chez le rat. En revanche, l'expression de ERR-2 est beaucoup plus faible et restreinte (Giguère et al, 1988). Plus récemment, l'équipe de Anders Berkenstam en Suède a montré par RT-PCR que l'homologue de souris de ERR-2 était exprimé dans des cellules ES dérivées des blastomères du blastocyste, ainsi que dans des cellules de carcinome embryonnaire non différenciées F9, ce qui suggère un rôle important de ERR-2 dans le développement embryonnaire précoce (Pettersson et al, 1996). L'étude par hybridation *in situ* de l'expression de ERR-2 au cours du développement embryonnaire a montré que ce récepteur était essentiellement exprimé au cours de la formation du chorion c'est-à-dire très précocement juste après l'implantation du blastocyste. Ceci semble suggérer que ERR-2 interviendrait dans la formation du chorion qui est une structure importante pour les échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus (Pettersson et al, 1996). Récemment, l'inactivation du gène ERR-2 par recombinaison homologue chez la souris a confirmé cette hypothèse. En effet, les embryons de

souris inactivés pour ERR-2 de façon homozygote, meurent à E10.5 à cause d'une mauvaise formation du placenta qui serait due à un développement anormal du chorion (Luo et al, 1997).

### 2.1.2) Fixation à l'ADN de ERR-1 et ERR-2.

ERR-1 possède une boîte P de séquence EACKA très conservée avec celle de ER (EGCKA). Ceci pourrait suggérer que ERR-1 se fixe sur le même site palindromique que ER, c'est-à-dire sous forme d'homodimères. Or, jusqu'à présent, ERR-1 s'est avéré se fixer à l'ADN seulement sous forme de monomères sur le même site que le récepteur orphelin SF-1, à savoir un site SFRE (pour « SF-1 Responsive Element », TCA AGGTCA) (Yang et al, 1996; Bonnelye et al, 1997; Johnston et al, 1997). C'est sur ce site que ERR-1 se fixe sur le promoteur de la lactoferrine et régule son expression (Yang et al, 1996). Cependant il existe une certaine flexibilité dans l'identité précise des bases de la partie 5' du site de reconnaissance de ERR-1. Ainsi, il a été montré que ERR-1 pouvait reconnaître la séquence CCA AGGTCA présente dans le promoteur tardif majeur de SV40 ainsi que la séquence TAA AGGTCA qui se trouve dans le promoteur du gène de la prolactine (Wiley et al, 1993; Johnston et al, 1997). On ne comprend donc pas encore très bien qu'elle est la cible privilégiée de ERR-1, vu les différentes possibilités d'éléments de réponse sur lesquels ce récepteur peut se fixer.

ERR-2 semble, lui, plus proche de ER en ce qui concerne son site de fixation. En effet, il est capable comme ER de se fixer sous forme d'homodimères sur un ERE (Pettersson et al, 1996). De plus, comme pour ER, la guanine localisée en seconde position dans l'élément de réponse ERE (AGGTCAN<sup>3</sup> TGACCT) est essentielle pour la fixation de ERR-2 à l'ADN. En effet, la mutation de cette guanine inhibe la fixation de ER mais aussi celle de ERR-2 sur ce site. ERR-2 et ER semblent donc partager le même mode de fixation et la même affinité pour le même élément de réponse, ce qui pourrait suggérer des gènes cibles communs à ces deux récepteurs (Schwabe et al, 1993; Pettersson et al, 1996).



**Figure 42:** ERR-1 est capable d'activer la transcription de la lactoferrine et potentialise l'activation conduite par ER sur ce promoteur. ERR-1 est aussi capable de d'agir comme répresseur sur le promoteur tardif de SV40.

### 2.1.3) ERR-1 et ses gènes cibles.

ERR-1 s'est donc avéré capable de se fixer sur un SFRE. Ce site est présent sur bon nombre de promoteurs régulés par les oestrogènes (Johnston et al, 1997). Ainsi, ERR-1 a été montré capable d'activer la transcription et de potentialiser les effets des oestrogènes sur un tel site présent dans le promoteur humain du gène codant la lactoferrine (Yang et al, 1996). Il a aussi été montré que ERR-1 et ER pouvaient interagir par des contacts protéine-protéine ce qui pourrait entraîner une synergie dans l'activation de l'expression de gènes cibles communs comme la lactoferrine (Yang et al, 1996; **figure 42**).

En revanche si ERR-1 se comporte comme un activateur de la transcription sur le promoteur de la lactoferrine, il est capable d'agir comme un répresseur sur le promoteur tardif de SV40 et la co-enzyme A deshydrogénase (Wiley et al, 1993; Sladek et al, 1997; **figure 42**). En conclusion ERR-1 semble en même temps pouvoir activer et réprimer la transcription et les raisons de ces divergences ne sont pas encore claires. De plus de façon intéressante, il apparaît pouvoir interagir avec ER ce qui suggère des régulation nouvelles. Ceci peut avoir de nombreuses répercussions physiologiques, ER intervenant dans de nombreux systèmes physiologiques comme l'ossification, la maturation des gonades, le maintien du cycle ovarien ainsi que le développement des glandes mammaires et leur régulation au cours de la gestation et de la lactation. Il nous semble donc important à ce stade de présenter quelques données de bases sur le récepteur des oestrogènes. Nous avons privilégié son rôle dans le développement osseux puisque nous avons montré que ERR-1, comme ER, est exprimé dans la formation de l'os.

## **2.2) Les oestrogènes et le métabolisme osseux.**

### 2.2.1) Cycle du remodelage osseux.

L'os est un tissu en perpétuel renouvellement. On assiste donc à un remodelage osseux permanent et qui fait intervenir deux types principaux de cellules osseuses: les ostéoblastes qui interviennent dans la fabrication du tissu osseux et les ostéoclastes qui sont responsables de la destruction de la matrice osseuse. Au début de chaque cycle, la matrice osseuse est recouverte par des ostéoblastes quiescents, ce qui constitue la phase quiescente (**figure 43 I**). C'est alors que vont survenir les précurseurs mononuclés des ostéoclastes

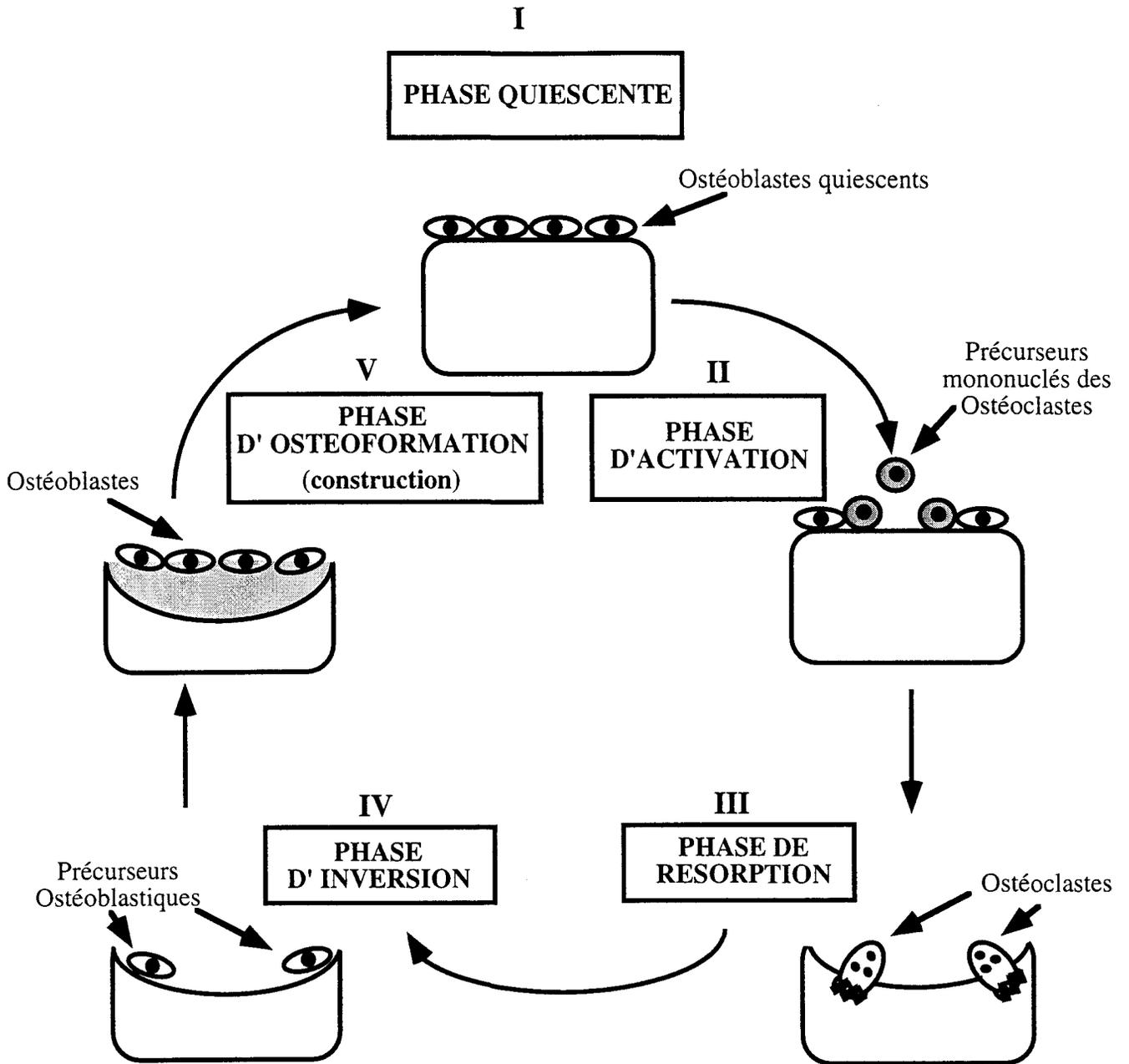


Figure 43: Cycle du remodelage osseux (d'après Vernejoul et Marie, 1993).

(figure 43 II). Cette phase d'activation est suivie de la phase de résorption lorsque les ostéoclastes résorbent l'os et forment une lacune (figure 43 III). Une fois la résorption suffisante, les ostéoclastes vont se détacher de la matrice osseuse et les précurseurs ostéoblastiques vont alors pouvoir les remplacer. C'est ce que l'on appelle la phase d'inversion (figure 43 IV). Les ostéoblastes vont fabriquer une nouvelle matrice osseuse et vont combler la lacune. C'est la phase de reconstruction qui débute (figure 43 V).

### 2.2.2) Effets des oestrogènes sur le remodelage osseux.

La formation ainsi que la résorption osseuse sont connues pour être sous le contrôle de certaines hormones et cytokines. Parmi les hormones, on trouve les oestrogènes qui semblent jouer un rôle crucial dans le métabolisme osseux. Plus précisément, les oestrogènes semblent intervenir dans le maintien de la balance entre la formation et la résorption dont les ostéoblastes et les ostéoclastes sont à la base. En effet, jusqu'à présent, les oestrogènes sont considérés comme un des meilleurs moyens de prévention et de traitement de l'ostéoporose qui est une pathologie caractérisée par une perte importante de la masse osseuse chez les femmes ménopausées. Ainsi, un traitement par les oestrogènes est capable d'induire une augmentation de la masse osseuse de plus de 5% et d'entraîner une baisse des risques de fractures vertébrales de 50% (Lufkin et Ory, 1995; Khosla et Riggs, 1995). Les oestrogènes semblent donc jouer un rôle dans la fabrication de l'os puisque leur élimination conduit à l'augmentation de la résorption de osseuse. Le problème est maintenant de comprendre comment les oestrogènes agissent et comment ils sont capables de conduire à de tels phénomènes.

Jusqu'à présent, les mécanismes d'action des oestrogènes dans l'os sont loin d'être bien compris. Certes, il a été montré que les ostéoblastes contenaient des récepteurs des oestrogènes. En effet, les équipes de Mark Haussler et de Lawrence Riggs, en réalisant des tests de fixation avec le  $17\beta$ -oestradiol marqué, ont permis de mettre en évidence la présence de ER dans des lignées ostéoblastiques, à raison de 200 molécules par cellule ainsi que dans des ostéoblastes obtenus après cultures primaire d'os (1615 molécules par cellule). Ce nombre de récepteurs est faible comparé à celui mis en évidence dans les organes de la reproduction qui est de 10 000 à 100 000 (Komm et al, 1988; Eriksen et al, 1988; revue dans Turner al, 1994). Le

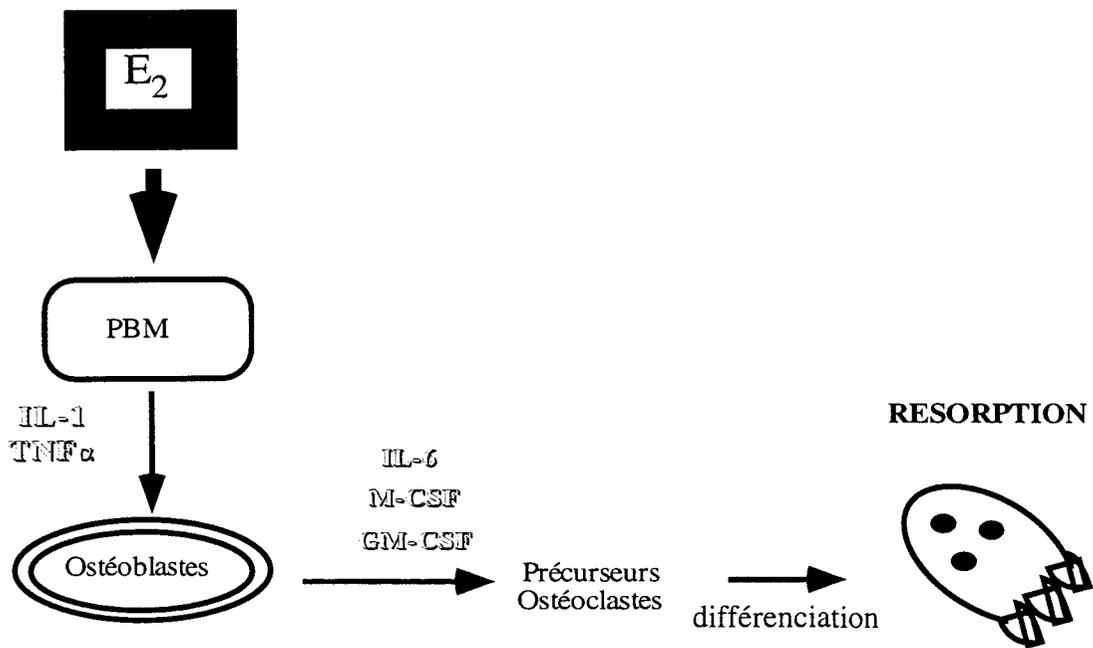
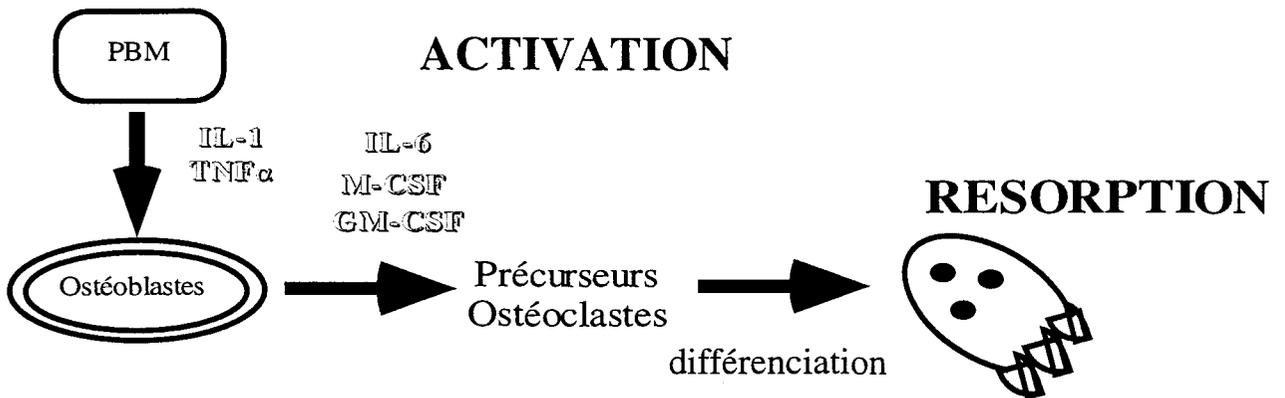
fait que ces récepteurs soient peu nombreux dans les ostéoblastes laisse donc planer un doute quant à leur rôle physiologique ou, en tous cas, quant à l'importance réelle de leur fonction. On peut cependant penser que certains des effets médiés par les oestrogènes passent par les ostéoclastes. En effet ER a été détecté dans les ostéoclastes à raison de 5600 molécules par cellule ce qui correspond à un taux de plus de trois fois supérieur au nombre de ER identifié dans les ostéoblastes (Oursler et al, 1991). De plus, un traitement aux oestrogènes diminue l'activité de résorption des ostéoclastes, ce qui corrèle avec les effets observés sur le remodelage osseux.

De plus, la découverte récente d'un deuxième récepteur des oestrogène (ER $\beta$ ), nous permettra peut-être de mieux comprendre les effets médiés par les oestrogènes dans l'os (Kuiper et al, 1996). En revanche, dans le cas où ER $\beta$  s'exprimerait dans l'os, il ne nous permettrait pas d'expliquer le nombre faible de molécules, capables de fixer des oestrogènes dans le tissu osseux. En effet les tests de fixation, réalisés dans les ostéoblastes et les ostéoclastes, avec le 17 $\beta$ -oestradiol marqué ont permis de comptabiliser le nombre global de molécules capables de fixer des oestrogènes à savoir ER $\alpha$  et ER $\beta$ .

Enfin, l'invalidation de ER $\alpha$  chez la souris est capable d'entraîner une baisse de la densité osseuse de 20 à 25%, ce qui suggère un effet direct de ER $\alpha$  dans la physiologie osseuse (revue dans Korach, 1994). Ceci montre que les oestrogènes et ER $\alpha$  interviennent dans le remodelage osseux mais la faible quantité de ER détectée dans les ostéoblastes et les ostéoclastes ne permet pas d'expliquer comment les oestrogènes peuvent produire de tels effets sur le remodelage osseux lors d'un traitement contre l'ostéoporose.

### 2.2.3) Rôle des oestrogènes sur la production de cytokines et de facteurs de croissances.

Plusieurs études semblent suggérer que les effets des oestrogènes sont indirects. En effet, il semblerait que les oestrogènes répriment des molécules intervenant dans la résorption osseuse. C'est le cas par exemple des cytokines comme les interleukines 1 (IL1) et 6 (IL6), du TNF $\alpha$  (pour « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ») et des facteurs GM-CSF et M-CSF

**A****B**

**Figure 44:** Schéma de la régulation de la production des cytokines par les oestrogènes. (A) La présence d'oestrogènes E<sub>2</sub> limite la production de IL-1 et TNF $\alpha$  par les monocytes sanguins périphériques PBM ("Peripheral Blood Monocyte"). Ceci limite la production de IL-6, par les ostéoblastes. Or l'IL6 est responsable de l'activation de la production de précurseurs ostéoclastiques. Ces précurseurs étant peu activés il y aura limitation du nombre d'ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. (B) En absence de E<sub>2</sub> on a augmentation de la production de IL-1 et TNF $\alpha$  qui vont induire une augmentation de la production de IL-6 par les ostéoblastes et donc provoquer une augmentation du nombre des précurseurs ostéoclastiques. L'augmentation du nombre des ostéoclastes après différenciation de ces précurseurs va être responsable d'une augmentation de la résorption osseuse. (d'après Horowitz, 1993).

(pour « Granulocyte, Macrophage Colony Stimulating Factor ») qui interviennent tous dans la résorption osseuse (revue dans Horowitz, 1993).

Plus précisément l'IL1 et le TNF $\alpha$  sont sécrétés par les monocytes sanguins périphériques (**figure 44A**). IL1 et le TNF $\alpha$  stimulent les ostéoblastes qui vont synthétiser de l'IL6, du GM-CSF et du M-CSF. Ces facteurs vont intervenir dans la stimulation et la différenciation des ostéoclastes et donc dans la résorption de l'os (revue dans Horowitz, 1993).

L'inhibition de la production d'oestrogènes par ovariectomie induit une augmentation de la production de l'IL1 et du TNF $\alpha$  (Girasole et al, 1992; revue dans Horowitz, 1993; **figure 44B**). Les ostéoblastes produisent alors deux fois plus d'IL6 puisque la sécrétion de cette cytokine est sous le contrôle de l'IL1 et du TNF $\alpha$ . La conséquence finale de ces régulations observées en absence d'oestrogènes, est une augmentation du nombre d'ostéoclastes d'environ de deux à dix fois et donc un accroissement de la résorption osseuse (Jilka et al, 1992, revue dans Horowitz, 1993). Il apparaît donc que les oestrogènes limitent la quantité de cytokines produites par les ostéoblastes ce qui permet de diminuer la résorption osseuse.

Les oestrogènes ont aussi été montrés capables d'augmenter la production de TGF $\beta$  (pour « Transforming Growth Factor  $\beta$  ») et plus particulièrement du TGF $\beta$ 3 (Yang et al, 1996). Le TGF $\beta$  est essentiel pour la formation osseuse puisqu'il stimule la synthèse, par les ostéoblastes, du collagène de type I, la protéine la plus abondante de la matrice osseuse. Il stimule aussi la prolifération ostéoblastique ce qui contribue à la formation de la matrice osseuse (revue Vernejoul et Marie, 1993). Les oestrogènes augmenteraient aussi la production d'IGF-I (pour « Insulin like Growth Factor I ») qui est présent dans la matrice osseuse et qui stimule la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques (revue dans Turner et al, 1994). Enfin les oestrogènes diminueraient l'activité de la PTH (pour « Parathyroid Hormone ») qui est un facteur ostéorésorbant (revue dans Turner et al, 1994). Tous ces mécanismes de régulation par les oestrogènes corèlent avec les effets de remodelage osseux observés lors de traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. De plus, la découverte récente du deuxième récepteur aux oestrogènes ER $\beta$  capable de fixer les oestrogènes comme ER $\alpha$ , permettra peut-être de mieux comprendre l'impact des oestrogènes sur le métabolisme osseux

(Kuiper et al,1996). L'existence des deux récepteurs ERR-1 et ERR-2 proches de ER permettra peut-être aussi de mettre en évidence d'autres voies de régulation *via* les oestrogènes, susceptibles d'expliquer comment ces hormones peuvent produire de tels effets sur le remodelage osseux. Ceci est d'autant plus possible que nous avons montré récemment que ERR-1 est capable de s'exprimer dans le tissu osseux.

## **RESULTATS**

## RESUME

### Article 1

#### **Rev-erb $\beta$ , a New Member of the Nuclear Receptor Superfamily, Is expressed in the Nervous System during Chicken Development.**

Comme nous l'avons montré dans l'introduction, le gène Rev-erb $\alpha$  est chevauché dans sa partie 3' par le gène c-erbA-1 qui code le récepteur de type  $\alpha$  des hormones thyroïdiennes (Miyajima et al, 1989, Lazar et al, 1989, Laudet et al, 1991). Ce chevauchement comprend l'exon 10 de c-erbA-1 et l'exon F de Rev-erb $\alpha$  (**figure 36**). L'existence de cette structure, sa conservation chez les mammifères où elle a été étudiée (homme et rat), nous a amené à penser qu'elle devait avoir une fonction qu'il fallait définir. Plusieurs hypothèses concernant la régulation de l'expression de ces deux gènes peuvent être avancées. Ces hypothèses se fondent sur l'idée générale selon laquelle l'expression de l'un des partenaires influencerait l'expression de l'autre. Selon ce modèle, une forte expression de Rev-erb $\alpha$  se traduirait par une diminution de l'expression de l'isoforme TR $\alpha$ 2 codée par c-erbA-1 et inversement (Lazar et al, 1990). Ainsi étudier ce chevauchement reviendrait à étudier les variations possibles de la balance entre le récepteur TR $\alpha$ 1 et l'inhibiteur TR $\alpha$ 2, donc la régulation de la réponse aux hormones thyroïdiennes.

Une approche pour essayer de mieux comprendre le rôle de ce chevauchement a été d'étudier sa mise en place au cours de l'évolution. On peut en effet imaginer que l'absence de chevauchement puisse entraîner une régulation différente des deux gènes de celle observée chez les mammifères. Ces nouvelles régulations nous permettraient, alors, de mieux comprendre pourquoi cette structure a été mise en place chez les mammifères. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'étudier cette structure chez les oiseaux et notamment chez le poulet. En effet chez le poulet, plusieurs travaux semblent suggérer que cette structure est différente de celle connue chez les mammifères. En effet, on ne connaît qu'un phage génomique contenant les sept premiers exons du gène c-erbA-1 chez le poulet. Un ADNc codant TR $\alpha$ 1

existe ce qui prouve que les exons équivalents aux exons 8 et 9 humains existent (Zahraoui et Cuny, 1987). Par contre, il a été impossible pour plusieurs équipes y compris nous même, d'isoler un phage génomique contenant la partie 3' (exons 8 à 10) du gène de poulet. De plus, des données d'expression par protection à la RNAase n'ont pas révélé l'existence d'un transcrit correspondant à l'isoforme  $\alpha 2$  chez le poulet (Forrest et al, 1990). Ces données laissent sans réponse la question de l'existence de cette structure chevauchante chez les oiseaux. Nous avons donc décidé de prendre le problème par l'autre coté en caractérisant Rev-erb $\alpha$  chez le poulet. Cette histoire a été pleine de rebondissements.

# Rev-erb $\beta$ , a New Member of the Nuclear Receptor Superfamily, Is Expressed in the Nervous System during Chicken Development<sup>1</sup>

Edith Bonnelye, Jean-Marc Vanacker, Xavier Desbiens, Agnès Begue, Dominique Stehelin, and Vincent Laudet<sup>2</sup>

Centre National de la Recherche Scientifique URA 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France [E. B., A. B., D. S., V. L.]; Angewandte Tumorstudiologie, Abteilung 0610, Deutsches Krebsforschungszentrum, P. 101949, D-69009, Heidelberg, Germany [J.-M. V.]; and Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq, France [X. D.]

## Abstract

We have identified and characterized a new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily in the chicken. This new gene, called *Rev-erb $\beta$* , exhibits strong homologies with the *Rev-erb $\alpha$ /ear-1* orphan receptor gene, which partially overlaps the thyroid hormone receptor  $\alpha$  gene in opposite orientation. We demonstrate that both *Rev-erb $\alpha$*  and *Rev-erb $\beta$*  genes are conserved in their C and E domains. *Rev-erb $\beta$*  binds to DNA as a monomer and recognizes the same binding motif as the  $\alpha$  gene product. The *Rev-erb $\beta$*  gene product does not interact with retinoid X receptors, as revealed by gel shift experiments. *In situ* hybridization experiments show that *Rev-erb $\beta$*  is expressed in the central and peripheral nervous system, spleen, and mandibular and maxillary processes, as well as in blood islands. During embryonic development, we noticed a striking specific distribution of *Rev-erb $\beta$*  transcripts in the notochord at 24 h and later on, in the floor plate of the neural tube. We propose that *Rev-erb $\beta$*  may play an important role in the complex network of inductive signals, which control neuron differentiation.

## Introduction

Nuclear receptors play an important part in cellular regulation, providing a direct link between extracellular hormonal signals and transcriptional responses (1, 2). These molecules are ligand-activated transcription factors that regulate the expression of target genes by binding to specific *cis*-acting sequences (3–5). This family includes nuclear receptors for hydrophobic ligands, such as glucocorticoids, estrogens, vitamin D, ecdysone, thyroid hormones, and retinoic acid. In addition to these receptors for known ligands, several authors have described "orphan receptors," which are putative receptors for ligands still to be identified (6, 7). Alternatively, it is conceivable that some orphan receptors act as constitutive transcriptional regulators (8). The unique action of nuclear receptors, such as thyroid hormone receptors, are due to their ability to bind tandem

repeats of the core sequence AGGTCA, which are organized either as palindromes, direct repeats, or inverted palindromes. These receptors avidly bind their target sequences through heterodimerization with RXRs<sup>3</sup> (5). A large number of heterodimers between RXRs and other nuclear receptors can be formed, and these various combinatorial interactions are thought to play a major role in the fine tuning of hormonal gene regulation (4).

Recently, some nuclear receptors have been shown to bind as monomers to the core sequence AGGTCA, such as NGF1B, FTZ-F1, or ROR $\alpha$  (8–10). In these cases, the protein directly contacts a specific A/T rich sequence, which is located just 5' to the AGGTCA motif. It has been suggested that these proteins make direct contacts with this A/T rich region through small regions of charged amino acids, the T and A boxes, situated in the vicinity of the DNA binding C domain (8, 11). This has also been shown for *Rev-erb $\alpha$* , for which the A/T rich sequence is A/T A A/T N T (11).

The *Rev-erb $\alpha$*  gene exhibits an additional interesting feature; both in humans and rats, it partially overlaps the *c-erbA-1* gene, which encodes THR $\alpha$  (12–14). Thus, *Rev-erb $\alpha$*  mRNA is complementary to the mRNA of a non-T3-binding splice variant of THR $\alpha$ , called  $\alpha$ 2, which acts as a dominant negative inhibitor of normal THR $\alpha$  (15–17). Such a structure probably plays an important role in the regulation of thyroid hormone action, although the mechanisms by which the two genes can possibly regulate their respective expressions are not well understood (18–20). *Rev-erb $\alpha$*  is expressed in adipocytes, brown fat, and muscles (13, 20). This gene is also widely expressed in brain and, more specifically, in the neocortex, as shown in rats by *in situ* hybridization (21). These experiments have also suggested that, in the neocortex, a mutually exclusive expression of *Rev-erb $\alpha$*  and THR $\alpha$ 2 transcripts may occur.

In this paper, we present the cloning and characterization of the chicken *Rev-erb $\beta$* , a new orphan receptor which exhibits strong sequence homologies with *Rev-erb $\alpha$* . We demonstrate that two *Rev-erb* genes actually exist in humans and chickens. The product of *Rev-erb $\beta$*  is able to bind DNA as a monomer and recognizes the same target sequence as *Rev-erb $\alpha$* . The expression pattern studied by *in situ* hybridization suggests that *Rev-erb $\beta$*  may be implicated in some aspects of nervous system development.

## Results

**Cloning of *Rev-erb $\beta$* .** Since *Rev-erb $\alpha$*  is highly expressed in skeletal muscles in humans and rats (12, 13), we used total mRNA from chicken muscle in order to isolate its avian homologue by RT-PCR experiments. To obtain a specific

Received 7/19/94; revised 9/26/94; accepted 9/29/94.

<sup>1</sup> This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique, and Institut Pasteur de Lille. V. L. is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale.

<sup>2</sup> To whom requests for reprints should be addressed.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: RXR, retinoid X receptor; THR $\alpha$ , thyroid hormone receptor  $\alpha$ ; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; bp, base pair(s); cDNA, complementary DNA; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HRE, hormone-responsive element; ROR, related orphan receptor.

Rev-erb amplification product, we used primers (*Rev-erb1* and *Rev-erb2*) corresponding to the most conserved regions of the C domain and to the T-box specific of *Rev-erb*. We obtained a 150-bp fragment which has 75% sequence identity with mammalian *Rev-erba* sequences. This PCR fragment was used to screen a chicken fibroblast embryo (E11) cDNA library. A 2.2-kilobase cDNA clone containing a single open reading frame was isolated. The ATG of this clone is in accordance with Kosak rules, with the only exception of a C in position -3, which is found only in rare occasions in vertebrate mRNAs (data not shown). Translation of this open reading frame predicts a protein of 549 amino acids clearly related to human and rat *Rev-erba* (Fig. 1A). Nevertheless, comparison with sequences of domains C, D, and E of mammalian *Rev-erba* revealed lower homologies (54%) than expected. In the conserved domains C, D, and E, the homology between mammalian and avian homologues of other nuclear receptors range between 99% (e.g., COUP-TF II) to 84% (e.g., estrogen receptor). The low degree of similarity between human and chicken Rev-erb proteins may be explained by rapidly accumulating mutations over time specific for this orphan receptor sequence. Alternatively, this could indicate that we had not isolated the real chicken homologue of *Rev-erba* but rather an orthologous, related gene.

To test this possibility, we used RT-PCR to search for a second *Rev-erb* gene in the human genome. Using the same set of PCR primers, we amplified reverse-transcribed mRNA from human HeLa cells. PCR products were cloned, and sequences of individual recombinants were analyzed. Of seven clones, we obtained one clone that is identical to the previously described human *Rev-erba* gene and six which represent a new, *Rev-erb*-related sequence. Comparison of the predicted amino acid sequence deduced from these six clones revealed a single amino acid change when compared to our chicken *Rev-erb* cDNA and three when compared to the mammalian *Rev-erba* gene (Fig. 1B). At the nucleotide level, the new human PCR clone contains 90% homology with the chicken clone and only 80% with mammalian *Rev-erba*. These data suggest that we have isolated a chicken cDNA corresponding to a new gene related, but distinct from, *Rev-erba* that we have called *Rev-erb $\beta$* . During the course of this work, we learned that the group of David D. Moore<sup>4</sup> isolated a new human cDNA called BD73, which is identical to our human PCR product at the amino acid level and can be considered as the human homologue of our chicken cDNA clone (Fig. 1). Amino acid sequences of the domains C, D, and E of human and chicken *Rev-erb $\beta$*  exhibit 85% of identity, a value which is similar to those obtained between other chicken and human homologous nuclear receptors. Recently, we obtained a new chicken cDNA clone that encodes a chicken homologue of the mammalian *Rev-erba* (data not shown). Thus, as in humans, two *Rev-erb* genes exist in the chicken genome.

The predicted chicken *Rev-erb $\beta$*  product appears clearly to be a member of the *Rev-erb* group since it exhibits the same characteristics of the  $\alpha$  gene: highly conserved specific T and A boxes located immediately downstream of the C domain and a long D domain shorter in the  $\beta$  gene than in the  $\alpha$  gene (12, 13; Fig. 1A). The NH<sub>2</sub>-terminal A/B

domain is poorly conserved. When compared to other nuclear receptors, *Rev-erb $\beta$*  exhibits the strongest homologies with peroxisome proliferator-activated receptors, retinoic acid receptors, and THR $\alpha$ s (31 to 34%), confirming the placement of *Rev-erb* genes inside the first subfamily of nuclear receptors (7, 22, 23). This observation is also confirmed by the phylogenetic reconstruction, which always clusters together peroxisome proliferator-activated receptors and *Rev-erb* genes (Fig. 1D).

To check whether the *Rev-erb $\beta$*  gene is conserved in other vertebrate groups, we decided to search for *Rev-erb $\beta$* -specific sequences in *Xenopus laevis*. Using nested degenerated primers *Rev-erb3*, *Rev-erb4*, and *Rev-erb5*, we performed PCR experiments searching for an exon of the E domain. We amplified a PCR fragment which was cloned, sequenced, and compared to both *Rev-erba* and *Rev-erb $\beta$*  genes (Fig. 1C). We obtained a clear *Rev-erb $\beta$*  signature, since the amino acid homology is 84% between the *Xenopus* sequence and the chicken *Rev-erb $\beta$*  and only 62% with the human *Rev-erba*. Thus, the *Rev-erb $\beta$*  gene appears conserved in amphibians.

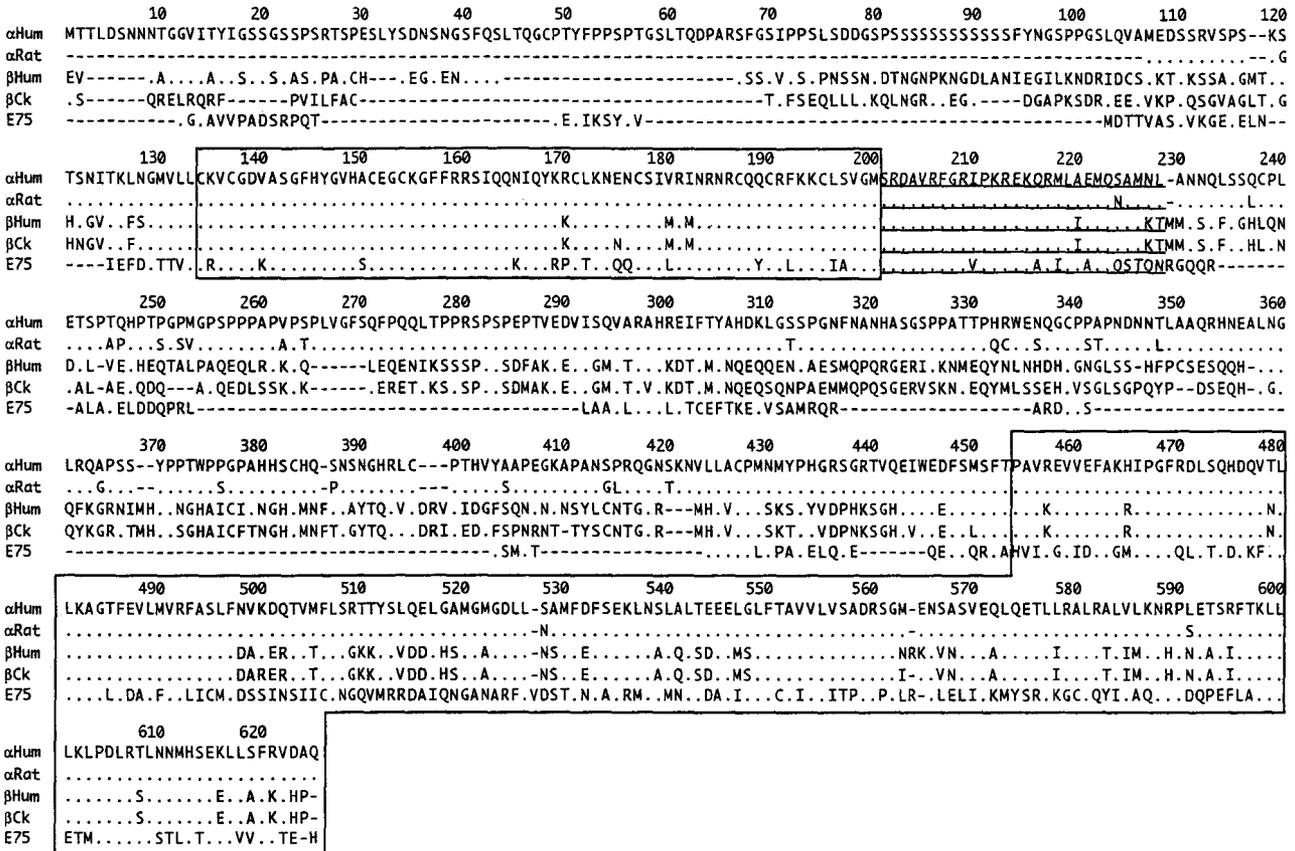
**Rev-erb $\beta$  DNA Binding Activity.** The *Rev-erba* gene product was recently shown to bind, as a monomer, the RevRE target sequence (Fig. 2A; Ref. 11), which can be separated into a AGGTCA core sequence recognized by almost all types of nuclear receptors, and a 5' A/T-rich specific sequence. We thus examined whether the *Rev-erb $\beta$*  product was also able to bind to the RevRE. *In vitro* translation of *Rev-erb $\beta$*  yielded a peptide of the expected size (60 kilodaltons; data not shown) that was used in EMSA and shown to bind to the RevRE as strongly as the product of *Rev-erba* (11). This binding is specific since it was competed out by a 10- or 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide, whereas a RevRE mutated in the three final positions of the AGGTCA motif was unable to compete with the probe (Fig. 2A, compare Lane 27 to Lanes 1 and 2 or Lanes 25 and 26, respectively). Consistent with the relative size of the proteins, the complex obtained with *Rev-erb $\beta$*  migrated slightly faster than the *Rev-erba*-induced complex (Fig. 2B).

The DNA binding features of *Rev-erba* and *Rev-erb $\beta$*  gene products were compared (Fig. 2A) by studying the competition potential of several mutations of the RevRE. All the competitors behaved, irrespective of the *Rev-erb* product used, an observation consistent with the strong sequence conservation of the DNA binding domain of the two proteins. We obtained essentially the same results as did Harding and Lazar (11) for the binding of *Rev-erba*, except for the T9C mutant, which clearly exhibited competitive behavior in our laboratory, whereas these authors only noticed a weak effect. Of note, strong alterations (but not a single point mutation of the 5' A/T-rich region, nucleotides 9 to 11) almost completely abolished competition, pointing to the importance of these bases. In contrast, mutations further upstream (e.g., 11-13C) or inside the AGGTCA core motif (C2G or A1C) only weakly affected competition.

Since numerous nuclear receptors are able to interact with the RXRs, we next examined whether *Rev-erb $\beta$*  was able to form a complex with RXR $\beta$  or RXR $\gamma$ . We showed that the binding patterns observed with *Rev-erba* or *Rev-erb $\beta$*  alone on RevRE probe were not altered by the presence of RXR $\beta$  or RXR $\gamma$  (Fig. 2B). We also verified that none of the *Rev-erb* products, either alone or in combination with RXR $\beta$  or RXR $\gamma$ , was able to bind to a palindromic HRE or to

<sup>4</sup> D. Moore, personal communication.

A



**B** alphaHum KRCLKNENCISIVRINRRCQQCRFKKCLSVGMSR  
 alphaHum .K.....M.M.....  
 betaCk .K...N...M.M.....  
 E75 RP.T..QQ...L.....Y..L..IA.....

**C** alphaHum SRTTYSLQELGAMGMGDLL-SAMFDFSEKLNLSL  
 alphaRat .....N.....  
 betaHum .GKK..VDD.HS..A....NS..E.....A.Q  
 betaCk .GKK..VDD.HS..A....NS..E.....A.Q  
 betaXen .GKK..VD..RS..A....NSV.E.....SA.Q  
 E75 NGQVMRRDAIQNGANARF.VDST.N.A.RM..MN

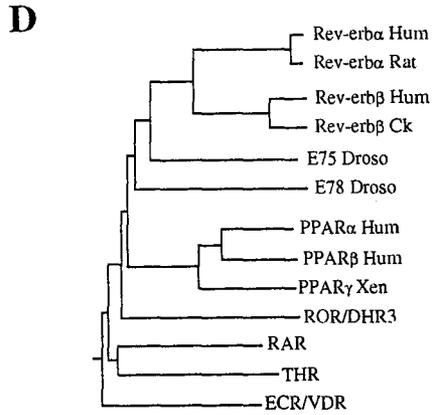


Fig. 1. A, alignment of the sequences of the chicken *Rev-erbβ* (*βCk*) with other members of the *Rev-erb* group; human *Rev-erba* (*αHum*; Ref. 12), rat *Rev-erba* (*αRat*; Ref. 13), human *Rev-erbb* (*βHum*)<sup>4</sup> and *Drosophila* E75 (*E75*; Ref. 45). The C and E domains are boxed; the TA boxes are underlined. B, comparison of the translated sequence of the human *Rev-erbb* PCR clone with other *Rev-erb* in the DNA binding domain. C, comparison of the translated sequence of the *Xenopus Rev-erbb* PCR clone (*βXen*) with other *Rev-erb* factors in the ligand-binding domain. Sequences were aligned with Clustal V; gaps are indicated by slashes, and amino acids identical to those of *αHum* are noted by points. D, phylogenetic tree obtained by the Neighbor-Joining method from the alignment of (A) showing the *Rev-erb* group inside the first subfamily of nuclear receptors.

a direct repeat of the core motif AGGTCA spaced by 4 nucleotides (DR4 element; data not shown; see also Fig. 2C for a positive control of RXRβ action). We conclude that, using these EMSA conditions (24, 25), none of the *Rev-erb*

products are able to interact with RXRs, at least for binding to RevRE or HREpal.

**Expression of *Rev-erbb*.** The expression pattern of *Rev-erbb* was first investigated by Northern blot analysis. Two

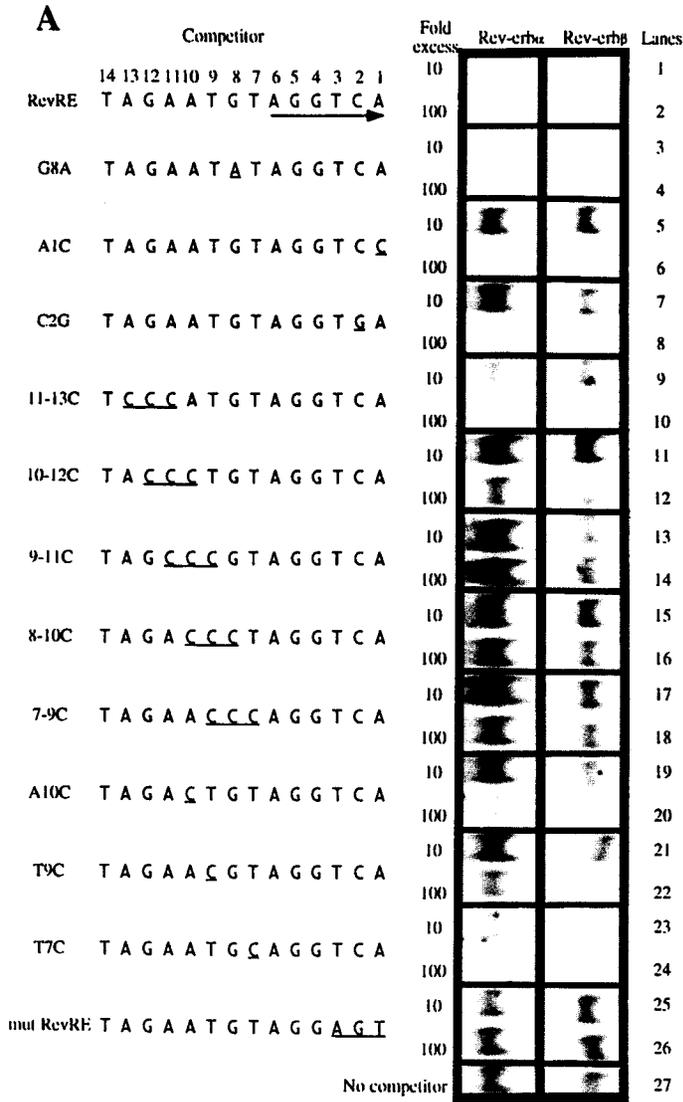
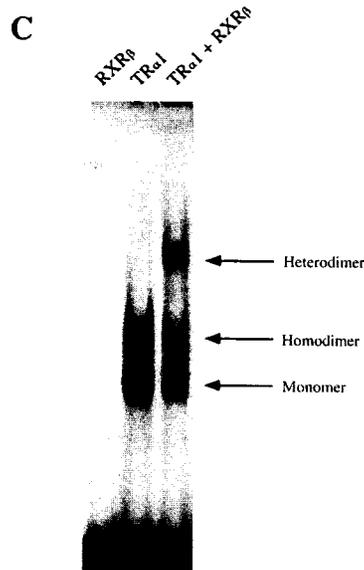
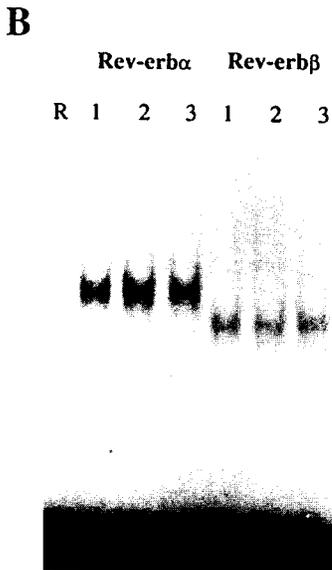
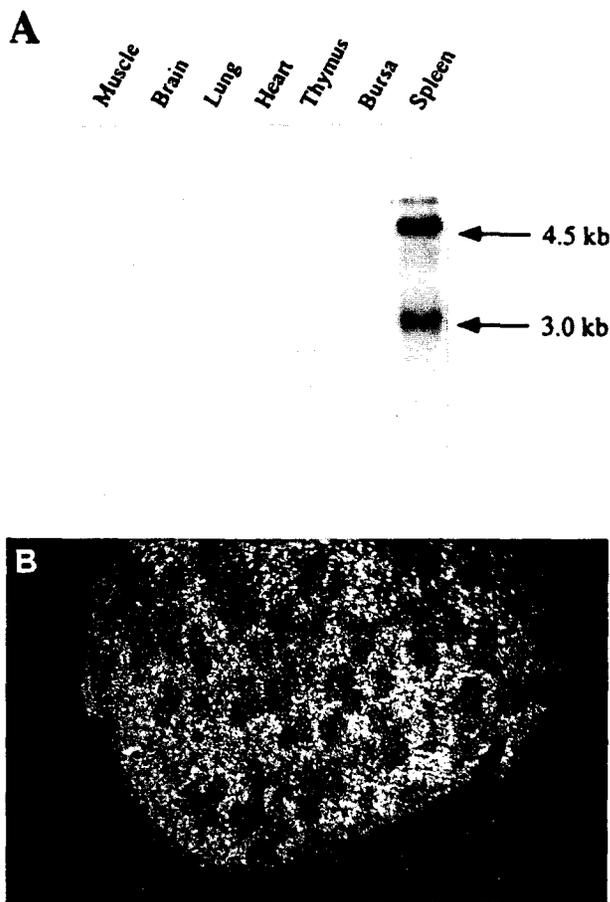


Fig. 2. A, EMSA realized with reticulocyte lysate-produced Rev-erb $\alpha$  or Rev-erb $\beta$  proteins and a labeled RevRE oligonucleotide as probe. For each lane, a 10- or 100-fold excess of the indicated cold competitor oligonucleotide was added, except for Lane 27, for which no competitor was added. The sequence of the RevRE and of the various mutants used for competition are indicated (B). EMSA realized with Rev-erb $\alpha$  or Rev-erb $\beta$  in absence (Lane 1) or presence of RXR $\beta$  (Lane 2) or RXR $\gamma$  (Lane 3). Lane R corresponds to an EMSA realized with unprogrammed reticulocyte lysate. C, EMSA realized with human THR $\alpha$ 1 in the presence or absence of RXR $\beta$  using a palindromic HRE. The position of the heterodimeric complex is indicated.





**Fig. 3.** Expression of *Rev-erbβ* in 1-day-old chickens. **A**, Northern blot showing *Rev-erbβ* expression in various organs after hatching. **B**, expression of *Rev-erbβ* by *in situ* hybridization in the spleen of 1-day-old-chickens. An adjacent section of the spleen hybridized with sense probe displays no signal (data not shown).

mRNA transcripts of 4.5 and 3 kilobases were detected (Fig. 3A). A very high expression level of these two transcripts was detectable in the spleen after hatching. *In situ* hybridization of spleen sections revealed a specific expression in granulocyte-rich regions (Fig. 3B). With a Northern blot containing mRNA extracted from mechanically dissociated spleen cells (26), we detected *Rev-erbβ* transcripts in the fraction containing granulocytes but not in other fractions (data not shown). Furthermore, we never observed a *Rev-erbβ* signal in mRNA extracted from thymus or bursa of Fabricius from 1-day-old chickens (Fig. 3A). Interestingly, we also detected *Rev-erbβ* mRNA in the extraembryonic blood islands of E1-stage embryos (Fig. 4, A and B) suggesting an expression in early erythroid cells. Consistent with this observation, *Rev-erbβ* mRNAs are present in erythroid cell lines such as 6C2 (data not shown). Thus, *Rev-erbβ* seems to be expressed in a variety of chicken hematopoietic cells of the erythrocytic and granulocytic lineages.

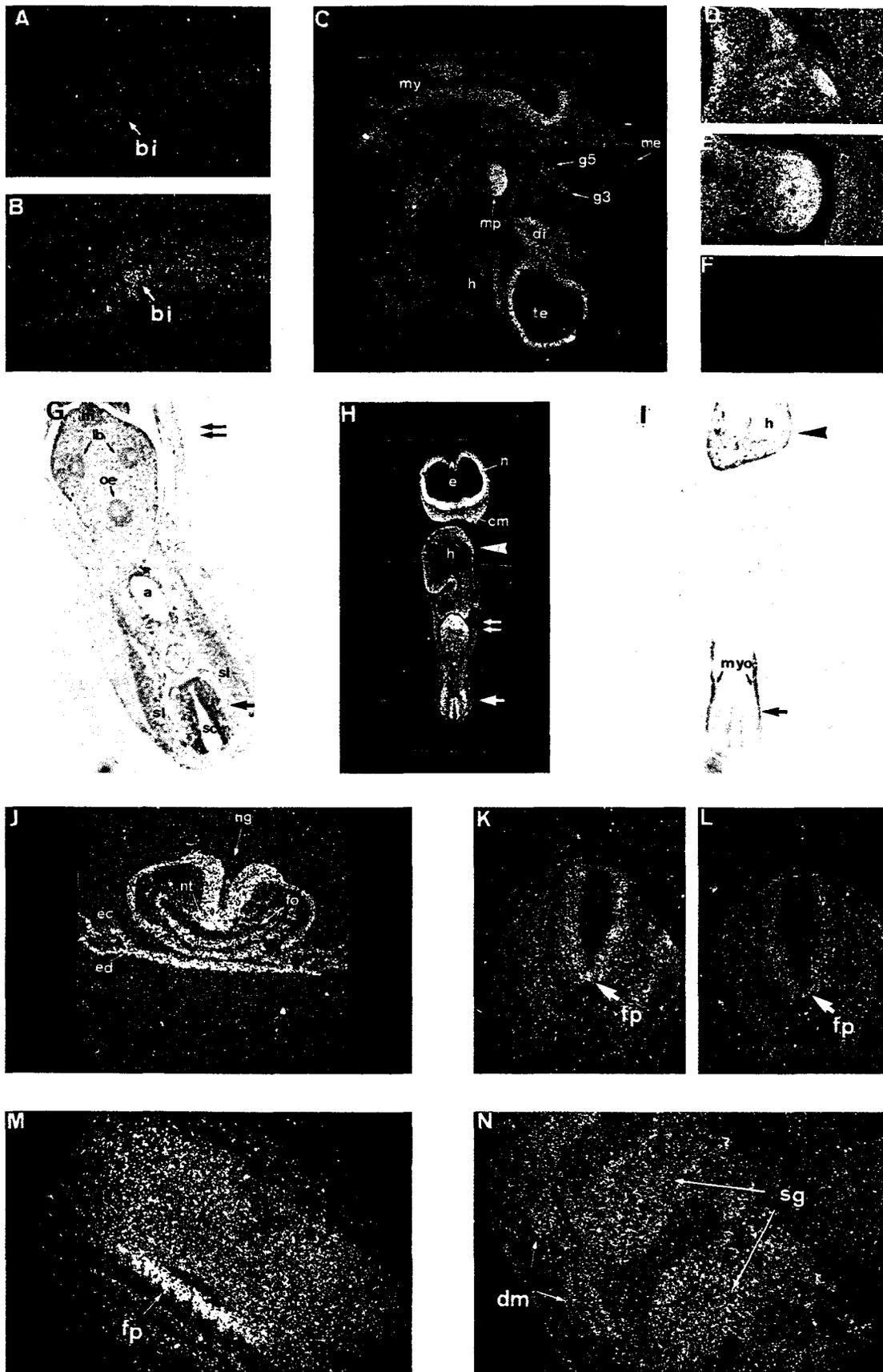
*In situ* hybridization was also performed on sagittal or transversal sections of E4, E6, and E7 chicken embryos. *Rev-erbβ* transcripts were distributed in the wall of all nervous system vesicles at E4, E6, and E7 (Fig. 4C and data not shown). Analysis of transversal sections also demonstrated

*Rev-erbβ* expression in the cephalic mesenchyme and neuroepithelium (Fig. 4H). Moreover, *Rev-erbβ* mRNAs were detected in both cranial ganglions 3 and 5 (Fig. 4D) at E4 and in E6 and E7 dorsal root ganglions (Fig. 4N). The Northern blot experiment showed a weak expression of *Rev-erbβ* in the brain after hatching (Fig. 3A). Interestingly, at E4 (Fig. 4, K and L), E6 (Fig. 4M), and E7 (data not shown), *Rev-erbβ* was strongly expressed in the ventral midline of the neural tube (*i.e.*, in the floor plate). No specific expression was seen in the lateral or dorsal part of the spinal cord. This specific floor plate expression prompted us to examine younger embryos, and we observed that, at E1, *Rev-erbβ* was expressed in notochord and in all of the the neural plate (Fig. 4J).

We also observed *Rev-erbβ* transcripts in mesodermal cells. At E4, a strong signal for *Rev-erbβ* was seen in differentiating somites (Fig. 4H). In order to precisely localize this expression, we used the monoclonal antibody 13F4, which is a marker of early embryonic heart muscle (Fig. 4I, arrowhead) and somitic myotome (Fig. 4I, arrow). Comparison between localization of sclerotome and myotome indicated that *Rev-erbβ* was expressed in migrating sclerotomal cells, which will give rise to vertebral bodies. *Rev-erbβ* expression was also detected in cephalic mesenchyme, which participates in the cephalic skullcap structure (Fig. 4H), as well as in maxillary components (data not shown) and in mandibular components of the first brachial arch (Fig. 4, E and F). As shown by 13F4 immunohistochemical labeling, *Rev-erbβ* was also detected in the myocardium (Fig. 4, H, arrowhead; Fig. 4I for 13F4 labeling). Finally, we noticed that the dorsal mesocardium (Fig. 4H, double-arrow; see an enlargement of this structure in Fig. 4G) was strongly labeled by our probe.

## Discussion

We have isolated and characterized *Rev-erbβ*, a new orphan receptor, isolated from a chicken cDNA library. The *Rev-erb* genes are new examples of nuclear receptors for which two different genes seem to encode proteins with apparently overlapping functions. As in other cases, the two *Rev-erb* genes seem to be conserved in all vertebrates and could be viewed as recently duplicated homologues of a unique ancestral gene which remains unique in *Drosophila* (E75; Ref. 45). However, this has to be experimentally proved by the analysis of *Rev-erb* genes in lower organisms. The *Rev-erbβ* gene seems not implicated in an overlapping structure like *Rev-erba* in mammals since it does not exhibit any open reading frame in its opposite strand. Furthermore, the rate of accumulation of mutations in the third position of codons in the region homologous to the overlapping region of chicken *Rev-erbβ* is not significantly different from the value in the more 5' regions. This contrasts with what it is observed in mammalian *Rev-erba* genes (data not shown). The discovery of *Rev-erbβ* also sheds light on the origin of the *c-erba-1/Rev-erba* overlapping locus. It has been proposed that this locus was created by translocation of one of the members inside the gene of the other (7, 27). This translocation would have created the alternative *c-erba-1* exon 10, which overlaps *Rev-erba*. This model implies that *Rev-erba*, and particularly its 3' part, is conserved during evolution and that the *c-erba-1* exon 10 is not (27). The fact that the 3' region of *Rev-erbβ* shows a high level of homology with *Rev-erba* gives a strong argument for this model, as does the absence of *c-erba-1* exon 10 in chicken (28).



*Rev-erb $\beta$*  presents strong homologies with the *Rev-erb $\alpha$*  gene product. In fact, the chicken *Rev-erb $\beta$*  protein appeared identical in structure to the rat or human *Rev-erb $\alpha$* . Indeed, both domains C and E are well conserved (94 and 73% identity, respectively). Interestingly, one of the most conserved regions among *Rev-erb $\alpha$* , *Rev-erb $\beta$* , and E75 lies outside the C domain in the T and A boxes. These boxes were described previously as necessary for the DNA binding as monomers of the orphan receptors NGF1B and SF1 (8). These two boxes seem also to be important for the DNA binding of RXRs, retinoic acid receptors, and THR $\alpha$ s, probably by establishing DNA contacts across the minor groove with the phosphate backbone located 5' to the AGGTCA core motif (29–31). Thus, it seems likely that, in most nuclear receptors, the T and A boxes are parts of the DNA binding domain, which could strengthen the interaction between the receptor and its target sequence. For monomer binding receptors (NGF1B, SF1/FTZ-F1, *Rev-erb*, RORs, and also THR $\alpha$ ), this stabilization is sufficient to ensure a stable monomer to bind to DNA, whereas in other cases, the receptors need homo- or heterodimeric interactions to achieve efficient DNA binding. Consistent with this model, known monomer binding receptors contain a high proportion of basic amino acids in the T and A boxes, which could be responsible for this increased interaction strength (8, 10). At least for NGF1B and SF1, some of the basic amino acids of the T and A boxes have been directly implicated in DNA binding. This model could explain why, although evolutionarily distant, the monomer binding receptors have all been acquired, by the same convergent way, the ability to bind DNA as monomers.

Consistent with its high homology with *Rev-erb $\alpha$* , *Rev-erb $\beta$* , the newly discovered nuclear receptor we described in this paper, binds to the RevRE as a monomer. In our analysis, we were unable to detect any binding of *Rev-erb $\beta$*  or *Rev-erb $\alpha$*  in palindromic HRE or in direct repeat elements spaced from 0 to 5 nucleotides (data not shown). This observation contrasts with the recent study of the rat *Rev-erb $\alpha$*  product, which was shown to bind to a DR4 element (32). Nevertheless, the DR4 element used by these authors contained 5' to the first repeat an A/T-rich sequence, which could be a perfect RevRE site with A or T nucleotides at critical positions (nucleotides 9 to 12; Fig. 2A). Based on mutant RevRE analysis, the *Rev-erb $\beta$*  product exhibits the same DNA binding specificities when compared to *Rev-erb $\alpha$* . This observation suggests that both proteins, when expressed in the same cell, will be able to compete for the occupation of the RevRE and, presumably, to regulate overlapping sets of genes. Furthermore, it is possible that other nuclear receptors capable of binding DNA as

monomers can bind to sites close to the RevRE. This could be the case of the recently described RORs, which recognize a monomeric response element closely related to the RevRE (10).

In this study, we have analyzed the expression of *Rev-erb $\beta$* . We were particularly intrigued by the high expression in notochord at E1 and in floor plate at later stages. Numerous studies have demonstrated that the notochord plays a crucial role in inducing cells of the ventral midline of the neural tube to become floor plate cells (recently reviewed in Refs. 33 and 34). The floor plate provides signals that regulate the development of motor neurons (35) and releases a diffusible chemoattractant molecule that stimulates and directs the growth of commissural axons *in vitro* (36–39). The differentiation of floor plate cells and motor neurons is associated with expression of different classes of genes. Only one class of transcription factors is known to be specifically expressed in floor plate: the members of the fork head/HNF3 family originally identified as liver-specific transcription factor (Ref. 40 and references therein). Indeed, HNF3 $\beta$  has been shown to control floor plate development since ectopic expression of this gene leads to various abnormalities of the brain and neural tube, including ectopic expression of floor plate-specific genes (40). Contrary to HNF3- $\beta$  expression, *Rev-erb $\beta$*  expression in the neural tube is intense at early stages (48 h) and later becomes restricted to the floor plate. Therefore, we hypothesized that *Rev-erb $\beta$*  is not particularly important for the induction of floor plate but rather in later aspects of neuronal development, such as axon guidance. The timing of expression of *Rev-erb $\beta$*  seems comparable with those of the recently described nestrins (38, 39), which are actively implicated in this process. The precise delineation of the spatio-temporal expression of chicken *Rev-erb $\beta$*  in the neural tube is now under way. The fact that *Rev-erb $\beta$*  encodes a member of the nuclear receptor superfamily, which could be regulated by a ligand still to be identified, is also very interesting. Such a ligand may play a role in the complex signaling pathways implicated in ventral neural tube differentiation.

In this study, we were also intrigued by *Rev-erb $\beta$*  expression in muscle. Whereas expression was visualized by Northern blot and in dorsal muscles at E6 (Fig. 4N), the *Rev-erb $\beta$*  transcription in myotome was absent. This observation would argue in favor of the possibility that *Rev-erb $\beta$*  occurs at later stages of muscle differentiation. This situation has been observed for some myogenic factors like myf-5, which is transiently expressed in myotome and accumulates later in the muscles (41).

Fig. 4. *In situ* hybridization study of *Rev-erb $\beta$*  expression in chicken embryos. A, the section of an E1 embryo blood island hybridized with sense *Rev-erb $\beta$*  probe exhibit no signal. B, expression of *Rev-erb $\beta$*  in an adjacent section with the antisense *Rev-erb $\beta$*  probe. C, sagittal sections through E4 embryo hybridized with *Rev-erb $\beta$*  antisense probe; a conspicuous expression is seen in neural vesicles, ganglions, and the mandibular component of the first branchial arch and, to a lesser extent, in heart and subsets of mesenchymal cells. D, E, and F, higher magnifications. *Rev-erb $\beta$*  is expressed in the cephalic ganglions 3 and 5 (D) and in the mandibular component of the first branchial arch (E). Hybridization performed with the sense probe showed no labeling over the background signal in the adjacent section (F). G to I, transverse sections of E4 chicken embryo hybridized with *Rev-erb $\beta$*  antisense probe or stained using a specific procedure. G, Picro Indigo Carmin and nuclear red staining of the section at the level of lungbud and the dorsal mesocardium. H, expression of *Rev-erb $\beta$*  in cephalic mesenchyme, heart (arrowhead), dorsal mesocardium (double arrow), and sclerotomal cells (arrow). I, adjacent section processed for immunohistochemistry using the monoclonal antibody 13F4, which recognizes a specific antigen expressed in the myogenic lineage in early embryonic heart (arrowhead) and in somitic myotome (arrow). J through N, expression of *Rev-erb $\beta$*  in the nervous system. J, expression of *Rev-erb $\beta$*  in E1 embryo in notochord and neural groove; K and L, expression in the floor plate of the neural tube at E4 (K, antisense probe; L, sense probe) and at E6 (M); N, parasagittal section of a E6 embryo showing labeled dorsal root ganglions and dorsal muscles. a, aorta; bi, blood island; cm, cephalic mesenchyme; di, diencephalon; dm, dorsal muscle; ec, ectoderm; ed, endoderm; eo, esophagus; fo, foregut; fp, floor plate; g3, ganglion 3; g5, ganglion 5; h, heart; lb, lung bud; m, mesocardium; me, mesencephalon; mp, mandibular process; my, myelencephalon; myo, myotome; n, neuroepithelium; nt, notochord; ng, neural groove; sc, spinal cord; sl, sclerotome; sg, spinal ganglion; te, telencephalon; e, encephalon.

## Materials and Methods

**PCR, Sequencing, and Northern Blots.** Messenger RNAs from chicken muscles were extracted according to standard methods (42). RT-PCR was performed using 15  $\mu$ g of mRNA and denatured at 90°C for 2 min with 3 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase from GIBCO/BRL with the buffer [0.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (Pharmacia), 1 unit of RNasin (Promega), 40 mg/ml bovine serum albumin (Promega), and 100 ng of specific primer] furnished by the supplier. The reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h, and the reaction products were denatured at 100°C for 5 min. PCR was conducted with TAQ polymerase and buffer from Amersham, using standard conditions, with the following 40 cycles: 94°C for 1 min, 45°C for 2 min, 72°C for 1 min, and a final elongation step of 7 min at 72°C. RT reaction was performed with degenerated primer *Rev-erb2* (corresponding to positions 1229–1251 in the human *Rev-erb $\alpha$*  cDNA; Ref. 12), which is localized in domain D, whereas the PCR reaction was performed with primers *Rev-erb1* (positions 1104–1124) and *Rev-erb2*. Oligonucleotide sequences used were: *Rev-erb1*, 5'-CAT CCA GCA GAA CAT CCA GTA-3' (1104–1124); *Rev-erb2*, 5'-AT(G/A) CG(T/C) CCA AAA CGC ACA GC(G/A) TC-3' (1229–1251); *Rev-erb3*, 5'-GT(G/A) AAI A(A/G)(A/G) C(C/T)C A(G/T)C TCC TC-3' (2230–2249); *Rev-erb4*, 5'-C(C/T)C A(G/T)C TCC TC(C/A) TC(G/A) (G/C)TA AG-3' (2221–2241); *Rev-erb5*, 5'GA(C/G) C(A/G)(G/T) AC(AT) GT(G/C) A(T/C)(G/C) TTC CT-3' (2100–2120).

PCR products were cloned in the PCR II vector from the TA cloning kit of Invitrogen Corporation with the conditions of the supplier. Sequencing was done on an Applied Biosystem 373A automatic sequencer using the PRISM kit. Northern blot analyses were performed using 20  $\mu$ g of total RNA and standard procedures (42). The probe used encompassed the 3' part of the chicken cDNA (position 448 to 1469). Spleen cells were fractionated as described (26).

Primers *Rev-erb3*, *Rev-erb4*, and *Rev-erb5* were used to perform nested PCR to search for *Xenopus Rev-erb* sequences. *Rev-erb3* and *Rev-erb5* allow the amplification of a 150-bp fragment, which was reamplified with primers *Rev-erb4* and *Rev-erb5* to obtain a 142-bp fragment.

**Isolation of cDNA Clones.** Approximately 800,000 recombinant bacteriophages from E11 chicken embryo fibroblast cDNA library constructed in  $\lambda$ gt11 (Clontech) were screened with a 150-bp *EcoRI* fragment of the chicken *Rev-erb $\beta$*  clone obtained by RT-PCR, which had been labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (NEN) by nick translation (Amersham). Positive clones were purified, and the *EcoRI* insert was subcloned into pUC19 vector for sequencing and in pSG5 vector for *in vitro* translation.

**Gel Shift Experiments.** Full-length human *Rev-erb $\alpha$*  or chicken *Rev-erb $\beta$*  was synthesized in reticulocyte lysates using the TNT kit from Promega. Synthesis yield was checked with [<sup>35</sup>S]methionine labeling of the proteins and migration of an aliquot in a sodium dodecyl sulfate-page gel (data not shown). Gel shift experiments (EMSA) were done as described (24). For the study of *Rev-erb*-RXR interactions, two stringency conditions for EMSA were used: those of Hupp *et al.* (Ref. 24; Fig. 2, B and C) and those of Graupner *et al.* (25), with identical results.

**In Situ Hybridization and Immunocytochemistry.** E1, E4, E6, and E7 chicken embryos and dissected organs were fixed at 4°C for 16 h in 4% paraformaldehyde in phosphate-

buffered saline containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dehydrated and embedded in paraffin. Five- $\mu$ m-thick sections were transferred to 3-aminopropyltriethoxysilane (TESPA; Aldrich)-coated slides and dried at 42°C for 2 days. *In situ* hybridization was performed as described (43) using a <sup>35</sup>S-labeled antisense RNA probe synthesized from a full-length chicken *Rev-erb $\beta$*  cDNA cloned in Bluescript II KS (Stratagene). To avoid any cross-hybridization with *Rev-erb $\alpha$*  mRNAs, hybridization was performed with stringent conditions (60°C). As a negative control, adjacent sections were hybridized with a <sup>35</sup>S-labeled sense RNA probe synthesized from the same template. At the end of the *in situ* hybridization protocol, nuclei were stained with bisbenzimidazole and appeared blue under fluorescent light. 13F4 monoclonal antibody was used as a specific marker for myogenic cells (44). Staining was performed using mouse antibody to the monoclonal antibody 13F4 and the biotin extravidin kit (Sigma), according to the manufacturer's specifications.

## Acknowledgments

We thank David D. Moore for communicating results prior to publication. We are grateful to Christophe Quéva for discussions about *Rev-erb $\beta$*  expression in floor plate, Violetta Iotsova for help in gel shift experiments, Rachid Safi for help in sequencing, and Catherine Ziller for the 13F4 antibody. We thank Hinrich Gronemeyer, Françoise Dieterlin, Simon Saule, Jean Coll, Jean Rommelaere, and Ji Hshiang Chen for stimulating discussions and critical reading of the manuscript. We thank members of the Endocrin'os Group for discussions, support, and friendship.

## References

- Green, S., and Chambon, P. In: M. Parker (ed.), Nuclear Hormone Receptors, pp. 15–33. London: M. G. Academic Press, 1991.
- Forman, B. M., and Samuels, H. H. Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.*, 4: 1293–1301, 1990.
- Evans, R. The steroid and hormone receptor superfamily. *Science (Washington DC)*, 240: 889–895, 1988.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 427–433, 1992.
- Laudet, V., and Stéhelin, D. Nuclear receptors: flexible friends. *Curr. Biol.*, 2: 293–295, 1992.
- Moore, D. D. Diversity and unity in the nuclear hormone receptors: a terpenoid receptor superfamily. *New Biol.*, 2: 100–105, 1990.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.*, 11: 1003–1013, 1992.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., and Milbrandt, J. The orphan receptor NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 5794–5804, 1993.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Hiji, A. K., Laudet, V., Keller, H., Wahli, W., and Dreyer, C. FTZ-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 2786–2797, 1994.
- Ciguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR $\alpha$ , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.*, 8: 538–553, 1994.
- Harding, H. P., and Lazar, M. A. The orphan receptor *Rev-erb $\alpha$*  activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 3113–3121, 1993.
- Miyajima, N. N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushima, S.-I., Matsubara, K.-I., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell*, 57: 31–39, 1989.
- Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S., and Chin, W. W. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA $\alpha$*  transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1128–1136, 1989.

14. Laudet, V., Bègue, A., Henry-Duthoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stéhelin, D., and Saule, S. Genomic organization of the human thyroid receptor  $\alpha$  (*c-erbA-1*) gene. *Nucleic Acids Res.*, *19*: 1105, 1991.
15. Izumo, S., and Mahdavi, V. Thyroid hormone receptor  $\alpha$  isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature (Lond.)*, *334*: 539–543, 1988.
16. Koenig, R. J., Lazar, M. A., Hodin, R. A., Brent, G. A., Larsen, P. R., Chin, W. W., and Moore, D. D. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding *c-erbA* protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature (Lond.)*, *337*: 659–661, 1989.
17. Katz, D., and Lazar, M. A. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant ( $\alpha 2$ ) is due to competition for binding sites on target genes. *J. Biol. Chem.*, *268*: 20904–20910, 1993.
18. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Cardona, G., and Chin, W. W. Gene expression from the *c-erbA $\alpha$ /Rev-ErbA $\alpha$*  genomic locus. *J. Biol. Chem.*, *265*: 12859–12863, 1990.
19. Munroe, S. H., and Lazar, M. A. Inhibition of *c-erbA* mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. *J. Biol. Chem.*, *266*: 22083–22086, 1991.
20. Chawla, A., and Lazar, M. A. Induction of *Rev-erba*, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the  $\alpha$ -thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, *268*: 16265–16269, 1993.
21. Bradley, D. J., Young, W. S., III, and Weinberger, C. Differential expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *86*: 7250–7254, 1989.
22. Amero, S. A., Kretsinger, R. H., Moncrief, N. D., Yamamoto, K. R., and Pearson, W. R. The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrinol.*, *6*: 3–7, 1992.
23. Dreyer, C., Keller, H., Mahfoudi, A., Laudet, V., Krey, G., and Wahli, W. Positive regulation of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol. Cell*, *77*: 67–76, 1993.
24. Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, *71*: 875–886, 1992.
25. Graupner, R., Wills, K. N., Tzukerman, M., Zhang, X.-K., and Pfahl, M. Dual regulatory role for thyroid hormone receptors allows control of retinoic acid-receptor activity. *Nature (Lond.)*, *340*: 653–656, 1989.
26. Lepince, D., Gesquière, J.-C., and Stéhelin, D. The chicken cellular progenitor of the *v-ets* oncogene, *p68<sup>c-ets-1</sup>*, is a nuclear DNA-binding protein not expressed in lymphoid cells of the spleen. *Oncogene Res.*, *5*: 255–265, 1990.
27. Keese, P. K., and Gibbs, A. Origins of genes: "Big Bang" or continuous creation? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*: 9489–9493, 1992.
28. Forrest, D., Sjöberg, M., and Vennström, B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes. *EMBO J.*, *9*: 1519–1528, 1990.
29. Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E., and Evans, R. M. Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$  DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science (Washington DC)*, *260*: 1117–1121, 1993.
30. Zechel, C., Shen, X.-Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H. Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR and D elements. *EMBO J.*, *13*: 1414–1424, 1994.
31. Zechel, C., Shen, X.-Q., Chen, J.-Y., Chen, Z.-P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.*, *13*: 1425–1433, 1994.
32. Spanjaard, R. A., Nguyen, V. P., and Chin, W. W. Rat *Rev-erbA $\alpha$* , an orphan receptor related to thyroid hormone receptor, binds to specific thyroid response elements. *Mol. Endocrinol.*, *8*: 286–295, 1994.
33. Smith, J. C. Dorsal-Ventral patterning in the neural tube. *Curr. Biol.*, *3*: 582–585, 1993.
34. Ingham, P. W. Hedgehog points the way. *Curr. Biol.*, *4*: 347–350, 1994.
35. Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T. M. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell*, *64*: 635–647, 1991.
36. Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G. S., Dodd, J., and Jessell, T. M. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature (Lond.)*, *336*: 775–778, 1988.
37. Bovolenta, P., and Dodd, J. Perturbation of neuronal differentiation and axon guidance in the spinal cord of mouse embryos lacking a floor plate: analysis of Danforth's short-tail mutation. *Development*, *113*: 625–639, 1991.
38. Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M., Mirzayan, C., Jessell, T. M., and Tessier-Lavigne, M. The nestrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, *78*: 409–424, 1994.
39. Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J., and Tessier-Lavigne, M. Nestrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*, *78*: 425–435, 1994.
40. Sasaki, H., and Hogan, B. L. M. HNF-3 $\beta$  as a regulator for floor plate development. *Cell*, *76*: 103–115, 1994.
41. Buckingham, M., and Tajbakhsh, S. C. R. Expression des facteurs myogéniques chez la souris: *myf-5*, premier membre de la famille des gènes *MyoD* à être transcrits au cours de la formation du muscle squelettique. *Acad. Sci./Life Sci.*, *316*: 1032–1039, 1993.
42. Maniatis, T., Fristch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
43. Quéva, C., Ness, S. A., Grässer, F. A., Graf, T., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. Expression pattern of *c-myb* and *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development*, *114*: 125–133, 1992.
44. Rong, P., Ziller, C., Pena-Melian, A., and Le Douarin, N. M. A monoclonal antibody specific for avian early myogenic cells and differentiated muscle. *Dev. Biol.*, *122*: 338–353, 1987.
45. Segraves, W. A., and Hogness, D. S. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.*, *4*: 204–219, 1990.

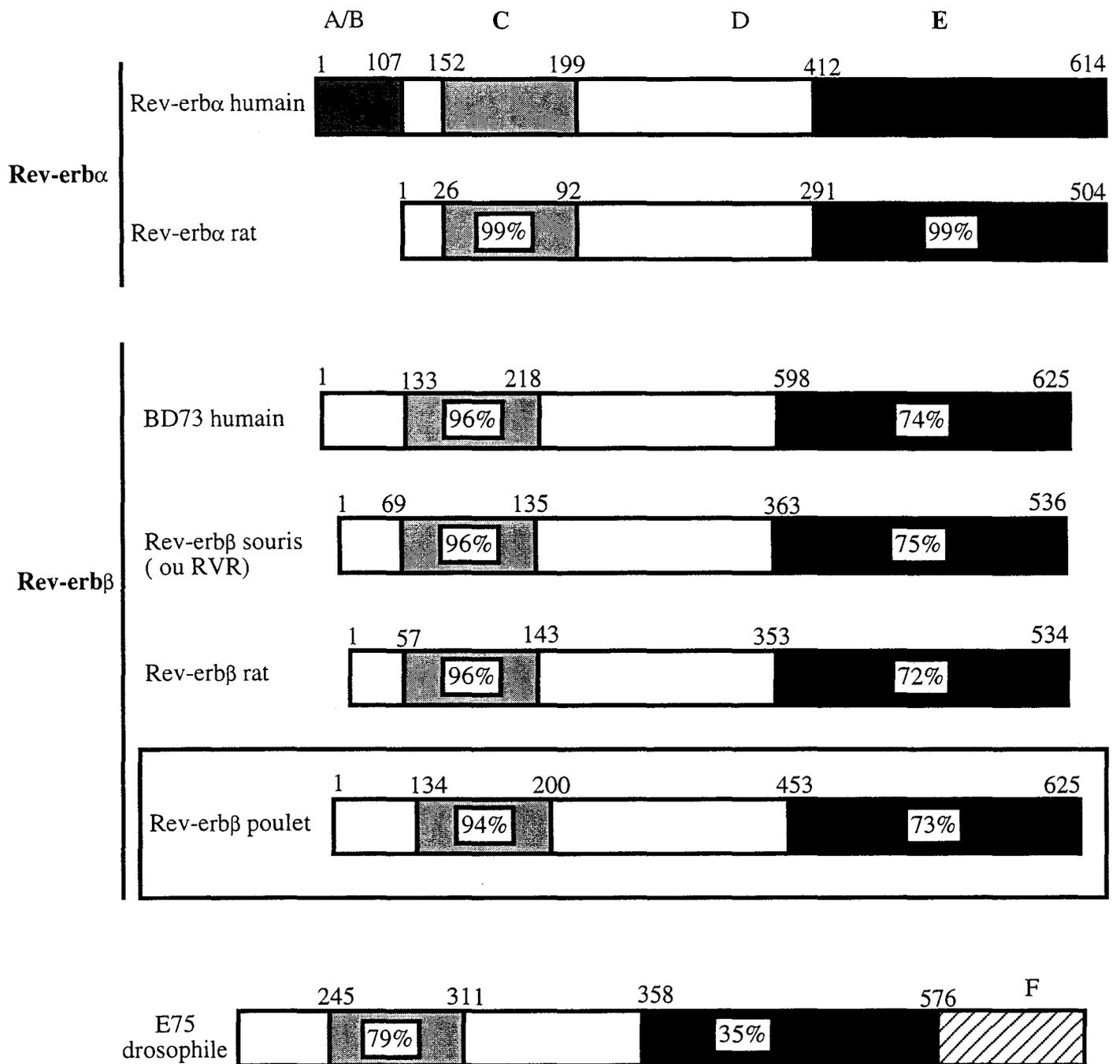
## Discussion de l'article 1

### 1) Rev-erb $\beta$ et les membres de la famille Rev-erb.

#### 1.1 Un point sur le chevauchement.

Notre travail visant à isoler Rev-erb $\alpha$  chez le poulet a conduit à la découverte de Rev-erb $\beta$  un nouveau récepteur nucléaire orphelin chez cette espèce (**figure 45**). On trouvera ci-dessous une discussion sur ce nouveau gène mais il nous paraît tout de même utile de faire un point sur la question de la mise en place du chevauchement c-erbA-1/ Rev-erb $\alpha$ . Après cette première tentative, nous avons isolé effectivement un ADNc correspondant à la partie 3' du gène Rev-erb $\alpha$  chez le poulet. Cet ADNc possède la partie homologue de la région chevauchante chez les mammifères. Ceci démontre bien que Rev-erb $\alpha$  existe chez le poulet. D'autre part toutes nos (nombreuses) tentatives pour isoler des phages génomiques correspondant à la partie 3' des gènes c-erbA-1 et Rev-erb $\alpha$  chez les oiseaux (poulet, caille, canard, émeu) sont restées infructueuses. Ces régions font visiblement partie de régions difficiles à cloner car d'autres équipes, comme celle de Bjorn Vennström, ont eu les mêmes difficultés (B.Vennström, communication personnelle). Des tentatives de localisation chromosomique chez le poulet des deux gènes c-erbA-1 et Rev-erb $\alpha$  menées en collaboration sont restées infructueuses. On ne sait, donc, toujours pas si les deux gènes sont chevauchants ou non chez le poulet. Un certain nombre d'arguments, notamment des « Southern blot » indiquent que ces deux gènes pourraient être proches l'un de l'autre mais ceci demande confirmation.

Dans une deuxième série d'analyses, nous avons cherché à savoir si la structure du locus était effectivement conservée chez tous les mammifères en le recherchant chez des mammifères précoces, comme les marsupiaux et les monotrèmes. Chez l'opossum *Caluromys philander*, un marsupial, nous avons montré que effectivement les deux gènes étaient chevauchants *via* une structure qui, au point où en sont les analyses, semble identique à celle de l'homme ou du rat. Affaire à suivre...



**Figure 45:** Représentation des identités de séquence des domaines C et E entre les différents membres de la famille Rev-erb. Les domaines C et E de Rev-erb $\beta$  de poulet que nous avons isolé présente 94% et 73% d'identité avec ceux de Rev-erb $\alpha$  humain.

## 1.2 Etudes fonctionnelles.

A l'époque de ce travail, la fixation à l'ADN de récepteurs sous forme monomérique venait tout juste d'être mise en évidence pour SF-1, NGFI-B et Rev-erb $\alpha$  et il paraissait très intéressant de savoir si Rev-erb $\beta$  pouvait aussi, se comporter de la même façon. Ainsi nous avons montré que Rev-erb $\beta$  de poulet se fixait également sous forme de monomère sur un RevRE. De plus, comme pour Rev-erb $\alpha$ , des mutations dans la partie 5', riche en bases A et T, du site RevRE (en position 9-11, 8-10 et 7-9) empêchent la protéine Rev-erb $\beta$  de poulet de se fixer à l'ADN. Ces résultats sont donc très semblables à ceux obtenus par l'équipe de Mitch Lazar (Harding et Lazar, 1993). En revanche, des mutations ponctuelles de l'adénine en position 9 et 10 qui se sont révélées indispensables pour la fixation de Rev-erb $\alpha$  ne semblent pas jouer un rôle si important pour la fixation de Rev-erb $\beta$  sur le RevRE. Il se pourrait donc qu'il y ait quelques différences en ce qui concerne la nature des résidus qui interagissent directement avec le RevRE.

Cependant, la notion d'une importance générale de la séquence riche en bases A et T localisée en 5' du site RevRE suggère le même mode de fixation entre ces deux récepteurs. De plus, une des régions les plus conservées entre Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  est constituée par les boîtes T et A. Celles-ci jouent un rôle essentiel dans la fixation monomérique des récepteurs SF-1, NGFI-B et de ROR (Wilson et al, 1993; Giguère et al, 1995). C'est *via* ces boîtes que ces différents récepteurs reconnaissent directement la zone riche en A et en T localisée en 5' de leur élément de réponse. La séquence de cette région en 5' varie, ce qui permet de conférer une spécificité de réponse pour chaque type de récepteur. La conservation des boîtes T et A entre Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  permet donc de comprendre leur spécificité à reconnaître un RevRE. Plus récemment Guillaume Adelmant a montré que Rev-erb $\beta$  de poulet pouvait aussi reconnaître le site RevRE naturel présent dans le promoteur de Rev-erb $\alpha$ . De plus, il a pu montrer, que sur ce site, Rev-erb $\beta$  réprimait, tout comme Rev-erb $\alpha$ , l'activité du promoteur de Rev-erb $\alpha$  (Adelmant et al, 1996).

En conclusion, nous avons montré que Rev-erb $\beta$  de poulet est capable d'agir comme les Rev-erb $\alpha$  de mammifère. Ceci suggère donc une bonne conservation de leur fonction au

cours de l'évolution ainsi que leur importance. Récemment nous avons cloné Rev-erb $\beta$  de poisson-zèbre, qui lui aussi, est capable de se fixer sur un RevRE et de réprimer l'activité du promoteur de Rev-erb $\alpha$  ce qui conforte notre hypothèse quant à la conservation et donc, à l'importance de la fonction des Rev-erb. Le couple Rev-erb $\alpha$ -Rev-erb $\beta$  est un excellent exemple de couple de gènes paralogues. Ces deux gènes, sont en fait issus d'une duplication de gènes qui a eu lieu relativement récemment, probablement lors de l'apparition des vertébrés. Rev-erb $\alpha$  et  $\beta$  sont donc tous les deux des homologues du gène unique de drosophile E75. Par PCR, Hector Escriva, dans l'équipe, a montré qu'une seule copie de gène existait chez un cordé très primitif, le balanoglosse tandis que deux copies existent chez tous les vertébrés étudiés. Nous avons, nous même, démontré l'existence d'un homologue de Rev-erb $\beta$  chez le xénope et la présence des deux gènes chez les poissons téléostéens. Toutes ces données sont donc en accord avec l'idée que Rev-erb $\alpha$  et  $\beta$  sont présents chez tous les vertébrés. De tels groupes de gènes paralogues sont très communs. Pour les récepteurs nucléaires on connaît ainsi les TR ( $\alpha$  et  $\beta$ ), les RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) etc...mais le scénario est vrai pour d'autres familles de gènes comme les gènes Hox (Holland et al, 1994). L'existence de ces copies paralogues pose le problème de leur fonction spécifique qui est bien illustré par le cas des Rev-erb. En effet, d'un point de vue fonctionnel ces deux gènes semblent parfaitement indistinguables. Leurs produits se fixent à l'ADN sur le même site et régulent la transcription de la même façon. Certes des différences de détail dans leurs capacités à reconnaître le RevRE ou à interagir avec les co-répresseurs existent mais elles sont relativement mineures. La grosse différence entre ces deux gènes réside en fait dans leur patron d'expression.

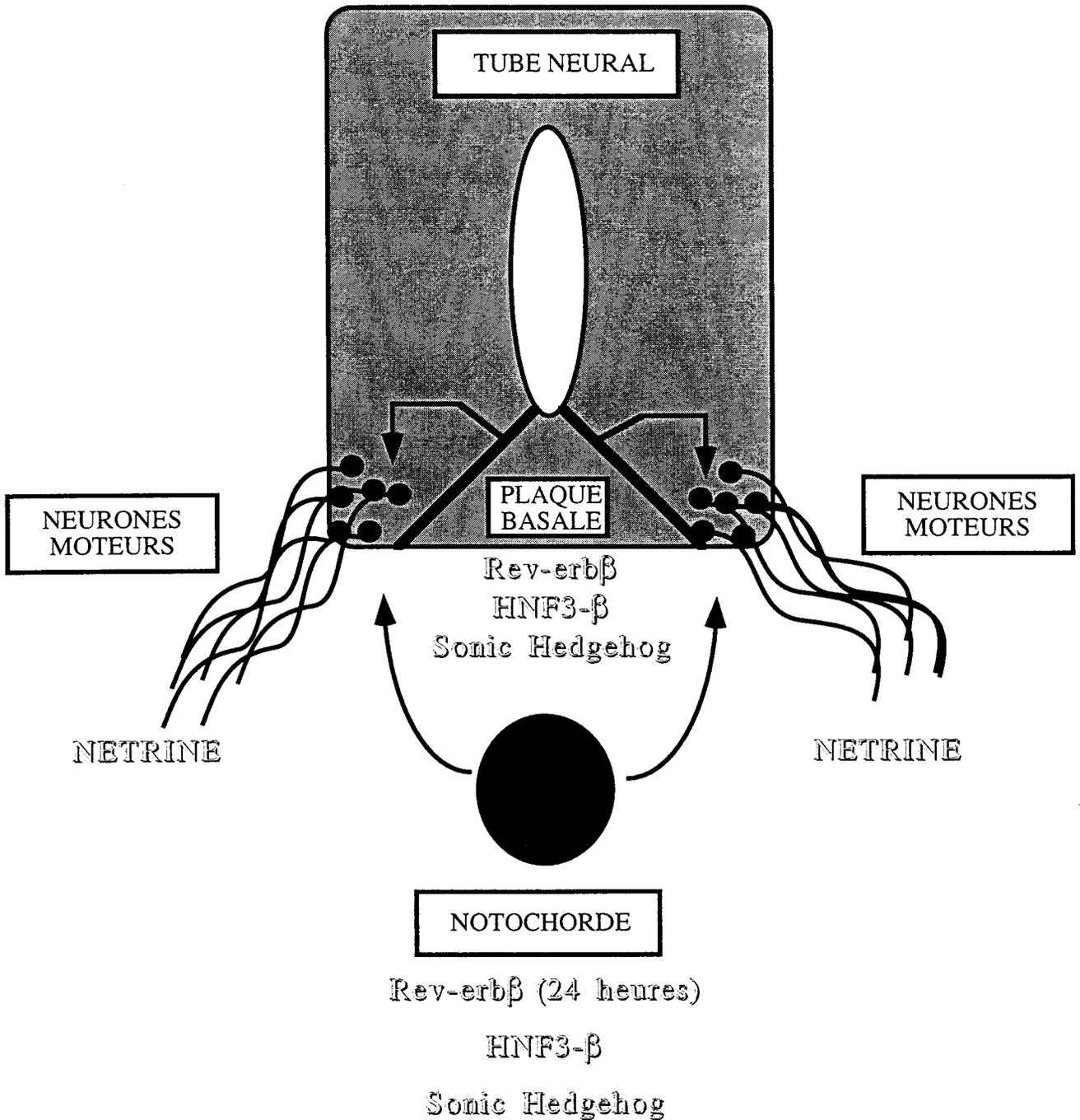
## **2) Rev-erb $\beta$ et le muscle.**

Des études basées sur des expériences de « Northern blot » avaient montré que Rev-erb $\alpha$  était exprimé dans le muscle squelettique et dans le coeur chez l'adulte (Lazar et al, 1989; Retnakaran et al, 1994; Forman et al, 1994; Dumas et al, 1994). En revanche, en ce qui concerne leur expression au cours du développement embryonnaire, aucune étude n'avait été entreprise. Afin d'émettre des hypothèses quant au rôle biologique de Rev-erb $\beta$ , nous avons donc étudié son expression au cours du développement embryonnaire de poulet. Ceci nous a

permis de montrer l'expression de Rev-erb $\beta$  dans le coeur à E4 et dans les muscles dorsaux à E6. Nous avons donc montré que Rev-erb $\beta$  était exprimé *in vivo* dans le muscle très précocement au cours du développement embryonnaire. De plus, Rev-erb $\beta$  n'a pas été détecté dans les précurseurs musculaires à savoir les myotomes qui contribuent à la musculature axiale au fur et à mesure que le développement se poursuit. Ceci semble donc suggérer que très tôt les Rev-erb interviennent dans la myogenèse sans pour autant intervenir au niveau des précurseurs myoblastiques.

Des études plus récentes ont été réalisées sur le rôle potentiel des Rev-erb dans la différenciation musculaire. Ainsi Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  de souris ont été montrés capables d'inhiber la différenciation musculaire et de maintenir les cellules musculaires à l'état de myoblastes (Downes et al, 1995; Burkes et al, 1996). Plus précisément, Rev-erb $\alpha$  et Rev-erb $\beta$  sont exprimés dans les myoblastes en prolifération et disparaissent dans les myoblastes en cours de différenciation. De plus, une surexpression de Rev-erb $\alpha$  inhibe l'expression de marqueurs de différenciation musculaires comme MyoD et la myogénine. MyoD est impliqué dans la détermination et la différenciation des myoblastes (Rudnicki et al, 1993; Buckingham et al, 1993). Il semblerait donc que, par rapport à MyoD qui s'exprime également dans des myoblastes en prolifération mais faiblement, les Rev-erb soit uniquement impliqués dans la détermination des myoblastes. En fait, si l'on avait à localiser les Rev-erb dans la voie de formation du muscle, il pourrait se localiser juste en amont de MyoD.

On pourrait donc imaginer que MyoD soit un gène cible des Rev-erb. Ceci est d'autant plus vraisemblable que Rev-erb $\alpha$  est capable d'inhiber la formation de l'hétérodimère TR/RXR sur un site DR4 localisé dans le promoteur de MyoD (Downes et al, 1995). Fait intéressant, l'acide rétinoïque et l'hormone thyroïdienne T3 qui sont les ligands respectifs de RXR et TR, interviennent dans la différenciation musculaire et activent l'expression de MyoD (Albagli-Curiel et al, 1993; Carnac et al, 1992). On peut donc imaginer le scénario suivant: Rev-erb $\alpha$  réprime l'expression de MyoD dans les myoblastes et inhibe donc la différenciation musculaire. L'expression de Rev-erb $\alpha$  est réprimée lors de la différenciation musculaire et c'est TR et RXR qui prennent le relais en venant se fixer sur le même site que Rev-erb $\alpha$  ce qui induit l'activation de l'expression de MyoD et donc la différenciation musculaire. En conclusion, les



**Figure 46:** La notochorde *via* la sécrétion du facteur Sonic Hedgehog induit les cellules de la partie ventrale du tube neural à devenir des cellules de la plaque basale qui vont ensuite envoyer des signaux capables de stimuler et de diriger la croissance des axones des neurones moteurs. Rev-erbβ de poulet est exprimé dans la notochorde (transitoirement à 24 heures) et dans la plaque basale et pourrait jouer un rôle dans la mise en place de ces structures.

Rev-erb semblent être essentiels dans la détermination des myoblastes ce qui semble corrélérer avec notre hypothèse du début concernant le profil d'expression entre Rev-erb et MyoD au cours du développement embryonnaire.

### 3) Rev-erb $\beta$ et le système nerveux.

Les Rev-erb ont aussi été montrés exprimés dans le cerveau adulte par des expériences de « Northern blot » (Lazar et al, 1989; Retnakaran et al, 1994; Forman et al, 1994; Enmark et al, 1994; Dumas et al, 1994). L'analyse de l'expression de Rev-erb $\beta$  au cours du développement embryonnaire, nous a permis de le détecter *in vivo*, dans les ventricules cérébraux (télencéphale, diencéphale, mésencéphale et myélocéphale). Son expression semble persister, quoique faiblement, après la naissance ce qui est cohérent avec sa présence chez l'adulte. En fait, le plus intrigant dans le profil d'expression de Rev-erb $\beta$ , est l'expression de Rev-erb $\beta$  dans la notochorde à 24 heures et dans la plaque basale du tube neural à E4, E6 et E7. En effet, ces deux structures sont essentielles pour la mise en place des neurones.

De nombreuses études ont montré que la notochorde *via* la sécrétion du facteur Sonic Hedgehog jouait un rôle crucial dans l'induction des cellules de la partie ventrale du tube neural afin qu'elles deviennent des cellules de la plaque basale (revue dans Smith, 1993). La plaque basale va alors induire la mise en place des neurones moteurs (Tessier-Lavigne et al, 1988; Yamada et al, 1993; **figure 46**). Plus précisément elle va permettre la libération de molécules chémoattractives, les nétrines, qui vont être capables de stimuler et de diriger la croissance des axones de ces neurones moteurs (Serafini et al, 1994; Kennedy et al, 1994). La différenciation de la plaque basale et des neurones moteurs est associée avec l'expression d'un certain nombre de gènes. C'est le cas de Sonic Hedgehog et du facteur de transcription HNF3- $\beta$  qui sont exprimés dans la notochorde et qui sont capables de contrôler le développement de la plaque basale (Sasaki et al, 1994; revue dans Ingham, 1994). Contrairement à Sonic Hedgehog et à HNF3- $\beta$ , Rev-erb $\beta$  est essentiellement exprimé dans la plaque basale et transitoirement dans la notochorde à 24 heures. Ceci semble donc suggérer que Rev-erb $\beta$  ne joue pas un rôle très important dans l'induction de la plaque basale mais plutôt dans le guidage des axones. En fait le profil d'expression de Rev-erb $\beta$  est à rapprocher de celui des nétrines et plus particulièrement de

la nétrine 1. Cette protéine est exprimée dans la plaque basale et intervient dans le guidage des axones commissuraux dans le tube neural (Serafini et al, 1994; Kennedy et al, 1994). Comme Rev-erb $\beta$ , la nétrine 1 est exprimée dans la notochorde lorsque le tube neural n'est pas encore fermé à 40 heures. Une fois le tube neural formé, la nétrine 1 est exprimée dans la plaque basale du tube neural à E4 ce qui correspond au profil de Rev-erb $\beta$  au cours du développement embryonnaire. La nétrine 1 continue d'être exprimée dans la plaque basale à E7. Ceci permet donc de suggérer que Rev-erb $\beta$  pourrait jouer un rôle dans ces phénomènes de guidage des axones et donc dans la différenciation nerveuse.

Enfin, le fait que Rev-erb $\beta$  soit un récepteur orphelin qui pourrait être régulé par un ligand est intéressant dans le sens où des molécules intervenant dans tous ces phénomènes de guidage d'axones pourraient se comporter comme des ligands potentiels. Nous avons essayé de rechercher le ligand de Rev-erb $\beta$  en suivant cette idée. Nous avons effectué des cultures primaires de tube neural de poulet à 7 jours de développement. Une fois les cellules à confluence, nous avons retiré le milieu devenu « conditionné » qui pouvait contenir un ligand potentiel. Ensuite, nous avons testé l'effet de ce milieu sur la capacité de Rev-erb $\beta$  à réguler positivement ou négativement la transcription. Pour cela, nous avons co-transfecté dans des cellules HepG2 un vecteur exprimant Rev-erb $\beta$ , avec un vecteur rapporteur LUC contenant en amont trois sites RevRE et un promoteur minimal SV40. Nous avons alors testé l'effet du milieu conditionné sur l'activité de Rev-erb $\beta$ . Malheureusement nos efforts sont restés vains, l'activité de Rev-erb $\beta$  ne variant pas à l'ajout de ce milieu. De plus, la majorité du temps nos cellules étaient contaminées par des fibroblastes ce qui diminuait, encore plus, nos chances de trouver le ligand susceptible d'être sécrété par les cellules nerveuses de la plaque basale. Mais tout espoir n'est pas perdu. En effet, l'existence de techniques de cultures primaires, presque pures, de tube neural, nous permettrait peut-être de travailler dans de meilleures conditions. On peut, en effet, penser que le ligand, s'il existe, soit présent *in vivo* en petite quantité dans le tube neural. Le fait que nos cellules soient envahies par des fibroblastes, n'a fait que diminuer la concentration du ligand sécrété par les cellules nerveuses dans le milieu conditionné. De plus, il est difficile de savoir à quelle concentration pourrait être présent le ligand putatif et donc si le

milieu conditionné doit être utilisé pur ou non. Ceci nous permettrait alors d'expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer d'activation de Rev-erb $\beta$  en présence du milieu conditionné.

#### **4) Résultats complémentaires: Identification du Rev-erb $\beta$ de poisson-zèbre.**

##### 4.1 Introduction.

Nous avons caractérisé Rev-erb $\beta$  chez le poulet ce qui nous a permis d'émettre des hypothèses sur la fonction de ce récepteur dans la différenciation nerveuse au vue de son expression dans la plaque basale. Cependant, il nous a semblé que l'expression de Rev-erb $\beta$  dans la plaque basale n'était pas continue le long de l'axe antéro-postérieur. Pour confirmer cette impression, nous avons alors essayé de réaliser des hybridations *in toto* avec une sonde froide sur l'embryon total de poulet à E4, à savoir le premier stade où l'expression de Rev-erb $\beta$  a été détectée dans la plaque basale par hybridation *in situ*. Mais, la sensibilité moindre de l'hybridation par sonde froide comparée à l'hybridation avec des sondes marquées au S<sup>35</sup> ainsi que de nombreux problèmes techniques, ne nous ont pas permis de mettre en évidence cette expression. Nous avons donc décidé de prendre une autre voie de recherche en utilisant le poisson-zèbre comme système biologique. La transparence qui caractérise le développement embryonnaire de ce poisson nous permettrait, en effet, peut-être de mettre en évidence l'expression de Rev-erb $\beta$  dans la plaque basale et de voir si celle-ci est discontinue au cours de la différenciation antéro-postérieur du tube neural. Nous avons donc décidé de rechercher Rev-erb $\beta$  dans le poisson-zèbre. Une fois identifié, nous avons décidé de le caractériser.

##### 4.2) Identification de Rev-erb $\beta$ de poisson-zèbre.

Notre stratégie d'isolement de Rev-erb $\beta$  chez le poisson-zèbre a suivi la démarche classique en deux étapes: une PCR (ou RT-PCR) de façon à disposer d'une sonde spécifique puis, dans un deuxième temps le criblage d'une banque ADNc à l'aide de cette sonde spécifique. Ce travail a permis de montrer que Rev-erb $\beta$  était conservé chez le poisson-zèbre. Par contre, nous n'avons pas pu isoler un homologue de Rev-erb $\alpha$  chez cette espèce. Pour résoudre le problème, de la conservation des deux gènes Rev-erb chez les poissons, nous avons

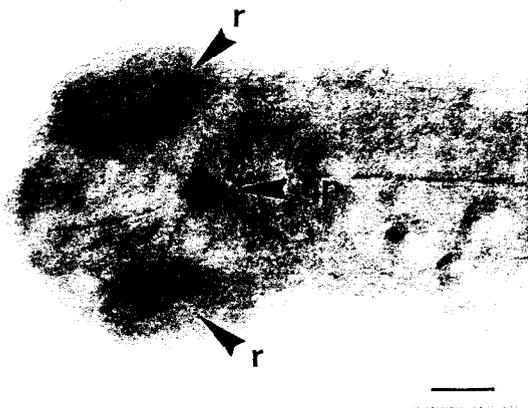
recherché Rev-erb $\alpha$  chez une autre espèce de poisson, la truite, où nous l'avons effectivement trouvé. Nous pensons, donc bien que les deux gènes existent chez les poissons téléostéens. Le fait que nous n'ayons pas isolé l'homologue de Rev-erb $\alpha$  chez le poisson-zèbre est sans doute lié à un problème méthodologique. Il suffit en effet, d'une mutation mal placée pour empêcher l'hybridation des oligonucléotides utilisés lors de la PCR. La recherche de Rev-erb $\alpha$  de poisson-zèbre se poursuit donc actuellement.

D'une façon surprenante au cours de ce travail, nous avons isolé un autre Rev-erb à la fois chez le poisson-zèbre et la truite. Ce gène n'est ni l'homologue de Rev-erb $\alpha$ , ni celui de Rev-erb $\beta$ . Nous pouvons poser deux types d'hypothèses pour expliquer son existence.

1) Il s'agit d'un troisième gène paralogue du groupe Rev-erb. C'est l'hypothèse du Rev-erb $\gamma$ . Dans un arbre phylogénétique cette séquence se place exactement comme pourrait le faire un troisième gène Rev-erb. Or, dans de nombreux cas chez les récepteurs nucléaires comme pour d'autres familles de gènes, il existe trois gènes paralogues. C'est le cas des RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  mais aussi des gènes ROR, très proches des Rev-erb nous l'avons vu, pour qui il existe également trois copies chez les vertébrés. Il n'est donc pas du tout impossible qu'il existe un troisième Rev-erb. Ce type de gène peut échapper longtemps aux investigateurs comme l'a prouvé la découverte récente de ER $\beta$ , plus de 10 ans après celle de ER $\alpha$  (Kuiper et al, 1996). Pour tester cette hypothèse, nous devons rechercher un homologue de ce Rev-erb $\gamma$  putatif chez d'autres espèces comme le poulet, la souris ou l'homme.

2) Il s'agit d'un produit de duplication d'un des deux gènes Rev-erb, spécifique du poisson-zèbre. En effet, comme beaucoup d'autres poissons, le poisson-zèbre est partiellement tétraploïde. Il contient par exemple 5 copies du complexe Hox et non pas 4 comme les autres vertébrés (Zardoya et al, 1996). Dans ce cas, l'existence de ce nouveau membre serait spécifique au poisson-zèbre et aux espèces proches. La position phylogénétique bizarre de cette séquence pourrait s'expliquer par le fait que la duplication des gènes induit souvent des modifications des vitesses d'évolution des différentes copies ce qui induit des topologies d'arbres artéfactuelles. Seule la recherche d'un homologue de ce gène dans d'autres espèces, nous permettra de trancher avec certitude.

47 A



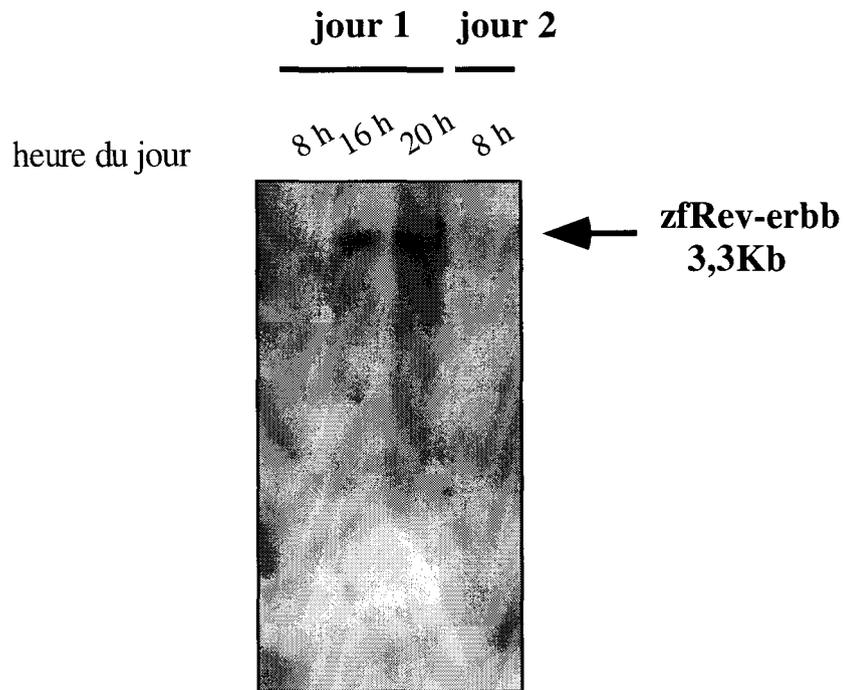
#### 4.3) Etudes fonctionnelles.

En ce qui concerne la caractérisation fonctionnelle, nous avons choisi de suivre la même stratégie que pour Rev-erb $\beta$  de poulet. Nous avons ainsi voulu savoir si les propriétés de fixation à l'ADN sur l'élément RevRE étaient conservées pour le Rev-erb $\beta$  de poisson. Nous avons montré que Rev-erb $\beta$  de poisson était capable, comme ses homologues d'oiseaux ou de mammifères, de reconnaître un élément RevRE. De plus, nous avons voulu déterminer son activité transcriptionnelle. L'activité de Rev-erb $\beta$  a donc été testée sur le promoteur de Rev-erb $\alpha$  humain qui contient un élément sur lequel Rev-erb $\alpha$  peut se fixer et réprimer l'activité de son propre promoteur. C'est en réalisant ces expériences, que nous avons montré que Rev-erb $\beta$  de poisson pouvait, lui aussi, réprimer l'activité du promoteur de Rev-erb $\alpha$ . Le rôle fonctionnel de Rev-erb $\beta$  de poisson semble donc être conservé au cours de l'évolution ce qui traduit l'importance de la fonction des Rev-erb dans la régulation de l'expression génique.

Enfin le but initial étant de déterminer le profil d'expression de Rev-erb $\beta$  au cours du développement embryonnaire, nous avons par hybridation *in toto* avec une sonde froide, étudié l'expression de Rev-erb $\beta$  de poisson-zèbre jusqu'à 48 heures de développement, un stade où l'organogenèse est presque terminée. C'est alors que nous avons eu la surprise de constater que le profil d'expression de Rev-erb $\beta$  dans la plaque basale n'était pas du tout conservé chez le poisson et qu'en fait ce profil était beaucoup plus restreint. En effet, Rev-erb $\beta$  s'est uniquement montré exprimé dans la rétine et la glande pinéale à partir de 36 heures de développement (**figure 47 A**). Ce patron d'expression, nous a donné l'idée de tester si ce gène pouvait être régulé en fonction du rythme circadien. En effet, la rétine et la glande pinéale sont deux organes très impliqués dans la régulation du rythme jour/nuit. Ainsi, l'afférence optique passe comme l'excitation lumineuse de la réaction pupillaire (rétine) par les voies nerveuses pour arriver au niveau de la glande pinéale encore appelée épiphyse. L'épiphyse permet ainsi la détermination de la longueur du jour et de la nuit réglant ainsi les rythmes circadiens. En bref, l'épiphyse est considérée comme un centre régulateur de l'état d'activité ou de repos de l'organisme en fonction de la lumière.

Nous avons donc extrait des ARNs de poisson-zèbre adultes à 8 heures, 16 heures, 20 heures et 8 heures (le lendemain) et utilisé la technique de « Northern blot » pour

**B**



**Figure 47** : Expression de *Rev-erb $\beta$*  de poisson-zèbre. (A) Patron d'expression de *Rev-erb $\beta$*  du poisson-zèbre à 36 heures de développement dans la rétine (r) et dans la glande pinéale (gp). (B) Mise en évidence par la technique de "northern blot" de la régulation de *Rev-erb $\beta$*  du poisson-zèbre au cours du rythme circadien. *Rev-erb $\beta$*  est régulé au cours de la journée avec un pic d'expression de 16 heures à 20 heures.

tester cette hypothèse. Nous nous sommes alors aperçu que l'expression de Rev-erb $\beta$  était régulée au cours de la journée, et qu'un pic d'expression de Rev-erb $\beta$  était induit de 16 heures à 20 heures alors qu'à 8 heures (du premier et du second jour) aucun messenger Rev-erb $\beta$  n'a pu être détecté (**figure 47 B**). Ces résultats suggèrent donc que Rev-erb $\beta$  est régulé selon le rythme circadien. Il nous reste cependant à vérifier l'hypothèse que ce pic d'expression n'est pas dû à la prise de nourriture qui, pour les poissons utilisés, était régulièrement distribuée à 12 heures. Si ces résultats se confirment, il sera intéressant, la fonction de Rev-erb $\beta$  étant d'après les tests que nous avons menés très conservée entre le poisson-zèbre et les mammifères, de savoir si cette régulation du gène Rev-erb $\beta$  est conservée ou non chez les mammifères.

Ceci est d'autant plus intéressant que certains des gènes ROR sont également régulés en fonction du rythme circadien. C'est le cas de ROR $\beta$  dans le cerveau (Schaeren-Wiemers et al, 1997). Sachant que les ROR et les Rev-erb ont une action antagoniste sur la transcription et que Rev-erb $\beta$  et ROR $\beta$  sont régulés en fonction du rythme circadien, il sera intéressant d'étudier l'expression d'un de leur cible, *N-myc*, au cours du rythme circadien: s'il est exprimé la nuit et réprimé le jour ceci pourra être expliqué par le fait (*i*) que Rev-erb est exprimé la journée et peut réprimer l'expression de ce gène et (*ii*) que ROR est exprimé la nuit et peut activer l'expression de *N-myc*. On serait donc en présence de la régulation de gènes dont l'expression est directement régulée par le rythme jour/nuit.

## RESUME

### Article 2

#### **The ERR-1 Orphan Receptor is a Transcriptional Activator Expressed During Bone Development.**

Les mécanismes d'action des hormones comme les stéroïdes sexuels dans le remodelage osseux sont encore mal connus mais sont très importants, comme dans le cas des oestrogènes. On sait, par exemple, qu'une carence en oestrogènes est corrélée à une perte osseuse qui se traduit par l'apparition d'une ostéoporose chez les femmes ménopausées. Les effets bénéfiques d'un traitement hormonal substitutif à base d'oestrogènes pour rétablir la masse osseuse sont maintenant bien établis (Khosla et Riggs, 1995).

Le récepteur ER capable de fixer l'oestradiol a été mis en évidence dans les ostéoblastes ce qui témoigne de la possibilité d'une action directe des oestrogènes sur le tissu osseux. Mais au vue de la faible concentration en ER (1615 molécules par cellules) mise en évidence par rapport aux tissus sexuels (entre 10 000 et 10 000 molécules par cellules), on peut supposer que l'effet des oestrogènes pourrait passer par autre chose que son récepteur classique dont on connaît maintenant deux exemplaires (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) (Komm et al, 1988; Eriksen et al, 1988; dans revue Turner et al, 1994, Kuiper et al, 1996). Le fait que ERR-1 soit un récepteur proche du récepteur aux oestrogènes, nous a initié à chercher si ce récepteur pouvait intervenir dans les mêmes processus physiologiques que ER. Un des tissus cibles majeurs de ER étant le tissu osseux, nous avons cherché à savoir si ERR-1 pouvait jouer un rôle dans la physiologie de ce tissu.

Pour répondre à cette question, nous avons voulu déterminer si ERR-1 était exprimé dans le tissu osseux. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, effectué des hybridations *in situ* sur des embryons de souris entre E15,5 et E17,5 à savoir le moment où le tissu ossifié commence à se former. C'est ainsi que nous nous sommes aperçu que ERR-1 était très exprimé dans l'os et plus particulièrement dans les zones d'ossification des os d'origine endochondrale (fémur, côtes, vertèbres) et d'origine membranaire (os maxillaire). En revanche,

aucune expression de ERR-1 n'a été détectée dans le cartilage. ERR-1 pourrait donc jouer un rôle dans la formation du tissu osseux.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, le remodelage osseux fait intervenir deux types cellulaires à savoir les ostéoblastes qui interviennent dans la formation osseuse et les ostéoclastes qui sont responsables de la destruction de la matrice osseuse (revue dans Vernejoul et Marie, 1993). Il nous a donc paru essentiel de savoir si ERR-1 était exprimé dans l'un de ces deux types cellulaires. Par des expériences de RT-PCR, nous avons recherché si ERR-1 était exprimé dans des lignées cellulaires (*i*) de type ostéoblastique: SaOS et TE85 des lignées d'ostéosarcomes, et des ostéoblastes humains normaux (*ii*) de type ostéoclastique dans la lignée FLG29.1 qui est une lignée provenant de leucémie humaine présentant des marqueurs de différenciation ostéoclastique. Nous avons ainsi montré que ERR-1 était exclusivement exprimé dans les ostéoblastes puisque l'ARN de ERR-1 n'a pas été détecté dans la lignée ostéoclastique FLG29.1.

Le fait que ERR-1 soit exprimé dans les ostéoblastes et exprimé dans la zone d'ossification au cours du développement embryonnaire, nous a encouragé à mener plus loin nos recherches concernant le rôle que pourrait avoir ERR-1 dans le métabolisme osseux. Nous avons donc voulu déterminer un gène cible de ERR-1 capable de jouer un rôle dans la formation du tissu osseux. Pour cela, il nous fallait déterminer l'élément de réponse sur lequel ce récepteur pouvait se fixer. Nous avons donc testé différents éléments de réponse connus pour les récepteurs nucléaires à savoir des répétitions directes, des palindromes et des sites monomériques et nous avons montré que ERR-1 pouvait se fixer sous forme de monomères sur le même élément de réponse que le récepteur orphelin SF-1 à savoir un SFRE, qui contient une séquence AGGTCA précédée des trois bases TCA.

Il nous a alors fallu déterminer l'activité de ERR-1 fixé sur ce site. Pour cela, nous avons effectué des expériences de transfection transitoire. Nous avons donc co-transfecté dans plusieurs cellules (Hela, NB-E, FREJ4, COS-1, et HepG2) un vecteur capable de synthétiser ERR-1 avec un vecteur rapporteur CAT (pour « chloramphenicol acetyltransferase ») contenant en amont un promoteur minimum tk (pour « thymidine kinase ») et cinq sites SFRE. Nous avons alors pu montrer que ERR-1 était capable d'activer la

transcription de manière cellule spécifique dans les cellules Hela, NB-E et FREJ4 mais pas dans les cellules HepG2 ou COS-1 ce qui suggère l'existence d'un facteur (ligand ou co-activateur) cellule spécifique capable d'intervenir dans l'activité transcriptionnelle de ERR-1. Nous avons également montré que ERR-1 pouvait activer la transcription du gène rapporteur CAT dans les cellules ostéoblastiques ROS 17.2/8.

Enfin, dans le but d'identifier un gène cible de ERR-1 jouant un rôle dans le métabolisme osseux, nous avons recherché des gènes présentant le même profil d'expression que ERR-1 au cours de la formation osseuse. C'est alors que notre attention s'est portée sur une protéine non-collagénique de la matrice osseuse, l'ostéopontine, exprimée comme ERR-1 dès le début de la différenciation osseuse au cours du développement embryonnaire (Sommer et al, 1996). Nous avons alors regardé les séquences du promoteur de l'ostéopontine et nous nous sommes rendu compte que celui-ci possédait 7 éléments SFRE plus ou moins parfaits (Craig et Denhardt, 1991). Nous avons donc testé l'activité de ERR-1 sur ce promoteur dans les cellules ROS 17.2/8 et nous nous sommes rendu compte que ERR-1 était capable d'activer plus de 4 fois l'activité du promoteur de l'ostéopontine.

En conclusion, nous avons montré (i) que ERR-1 était exprimé, *in vivo*, dans les zones d'ossification au cours du développement embryonnaire (ii) qu'il pouvait activer l'expression de l'ostéopontine, une protéine de la matrice osseuse, dans des cellules ostéoblastiques. Ceci semble donc suggérer un rôle *in vivo* de ERR-1 dans la formation du tissu osseux.

# The ERR-1 Orphan Receptor Is a Transcriptional Activator Expressed During Bone Development

Edith Bonnelye\*, Jean Marc Vanacker\*, Tanja Dittmar, Agnes Begue, Xavier Desbiens, David T. Denhardt, Jane E. Aubin, Vincent Laudet, and Brigitte Fournier

Endocrin'os group (E.B., J.M.V., A.B., V.L.)  
CNRS UMR 319  
Mécanismes du développement et de la Cancérisation  
Institut de Biologie de Lille  
59021 Lille Cedex France

Novartis Pharma AG (T.D., B.F.)  
K125 9-17, P11002 Basel, Switzerland

Department of Biological Sciences (D.T.D.),  
Rutgers University  
Piscataway, New Jersey 08855

Department of Anatomy and Cell Biology (J.E.A.)  
University of Toronto  
Toronto, M5S 1A8 Canada

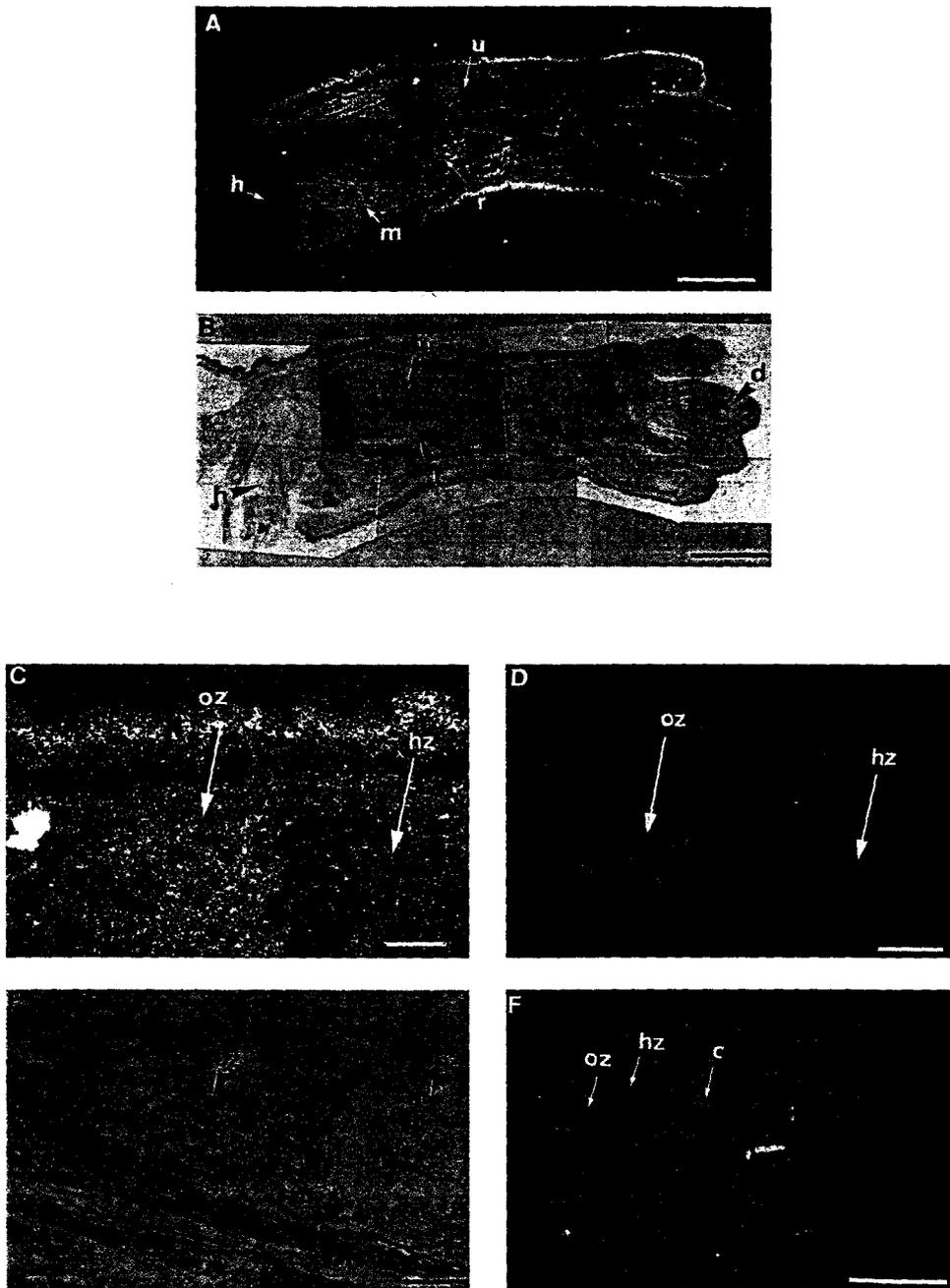
Centre de Biologie Cellulaire du Développement (X.D.)  
Université des Sciences et Techniques de Lille  
Villeneuve d'Ascq, France

**We studied the expression of estrogen-related receptor ERR-1 during mouse embryonic development. ERR-1 mRNA is present in bones formed by both the endochondral and intramembranous routes, and the onset of its expression coincides with bone formation. By RT-PCR experiments, we found that ERR-1, but not the related receptor ERR-2, is expressed in osteoblastic osteosarcoma cell lines as well as in primary osteoblastic cell populations derived from normal human bone. By gel shift analysis we found that ERR-1 binds as a monomer specifically to the SFRE sequence (SF-1-responsive-element; TCAAGGTCA). Mutation analysis revealed that both the core AGGTCA motif and the TCA 5'-extension are required for efficient ERR-1 binding. In transient transfection assays, ERR-1 acts as a potent transactivator through the SFRE sequence. This effect is cell-specific since ERR-1 activates transcription in the rat osteosarcoma cell line ROS 17.2/8 as well as in HeLa, NB-E, and FREJ4 cells but not in COS1 and HepG2 cells. Notably, the osteopontin (a protein expressed by osteoblasts and released in the bone matrix) gene promoter is a target for ERR-1 transcriptional regulation. Our findings suggest a role for ERR-1 in**

**bone development and metabolism. (Molecular Endocrinology 11: 905-916, 1997)**

## INTRODUCTION

Nuclear receptors are transcription factors that are involved in various physiological regulatory processes. The superfamily in which they are grouped comprises ligand-dependent molecules such as the steroid hormone-, thyroid hormone-, or retinoic acid receptors, but also an increasing number of so-called orphan receptors, for which no ligand is known (1, 2). The various orphan receptors are likely to play important functional roles since their sequences are highly conserved in mammals and even between phyla (3), and they often display restricted spatial and temporal patterns of expression. The activity of nuclear receptors is controlled at several levels, including their expression (and its level) in the tissues and cells in which they act. This regulatory mechanism may be particularly important in the case of orphan receptors that may lack ligand-associated modulation. Conversely, determination of the expression patterns of orphan receptors may give important clues in the search for their functions. This was recently exemplified in the case of Steroidogenic Factor 1 (SF1), which was shown to be expressed in the hypothalamo-pituitary axis and in the gonad and, concomitantly, demonstrated to regulate



**Fig. 1.** *In Situ* Hybridization for ERR-1 Expression in Mouse Embryos

A, A longitudinal section of forelimb at 17.5 days post coitus (p.c.) with ERR-1 antisense probe. *Bar*, 1400  $\mu$ m. B, Picro-indigo-carmin coloration of a forelimb (adjacent to A) at 17.5 days p.c. showing the ossification zone (oz). *Bar*, 1400  $\mu$ m. C, Higher magnification of the ulna bone; ERR-1 antisense probe. *Bar*, 70  $\mu$ m. D, Hoechst labeling of the same section, staining the nuclei and thus the tissular organization. *Bar*, 70  $\mu$ m. E, Picro-indigo-carmin coloration of a portion of the ulna showing the ossification zone. *Bar*, 70  $\mu$ m. F, A section of an ulna bone hybridized with sense ERR-1 probe. *Bar*, 1000  $\mu$ m. G, Section of a femur hybridized with the antisense probe. *Bar*, 750  $\mu$ m. H, Section of a femur hybridized with the sense probe. *Bar*, 750  $\mu$ m. I, Magnification of the ossification zone (oz) of the femur hybridized by ERR-1 probe. *Bar*, 200  $\mu$ m. J, Picro-indigo-carmin labeling of the femur. *Bar*, 750  $\mu$ m. K, Humerus head section hybridized by ERR-1 antisense probe. *Bar*, 750  $\mu$ m. L, Picro-indigo-carmin coloration of the humeral head. *Bar*, 750  $\mu$ m. M, Section of a vertebral arch hybridized with ERR-1 antisense probe. *Bar*, 175  $\mu$ m. N, Picro-indigo-carmin coloration of the vertebral arch. *Bar*, 175  $\mu$ m. O, Maxillary bone section hybridized with ERR-1 antisense probe. *Bar*, 50  $\mu$ m. P, Picro-indigo-carmin coloration of a section of maxillary bone. *Bar*, 175  $\mu$ m. c, Cartilage; d, digit; di, diaphyse; e, epiphyse; fh, femur head; h, humerus; hz, hypertrophic zone; ma, maxillary bone; m, muscles; nt, neural tube; oz, ossification zone; r, radius; u, ulna; va, vertebral arch.

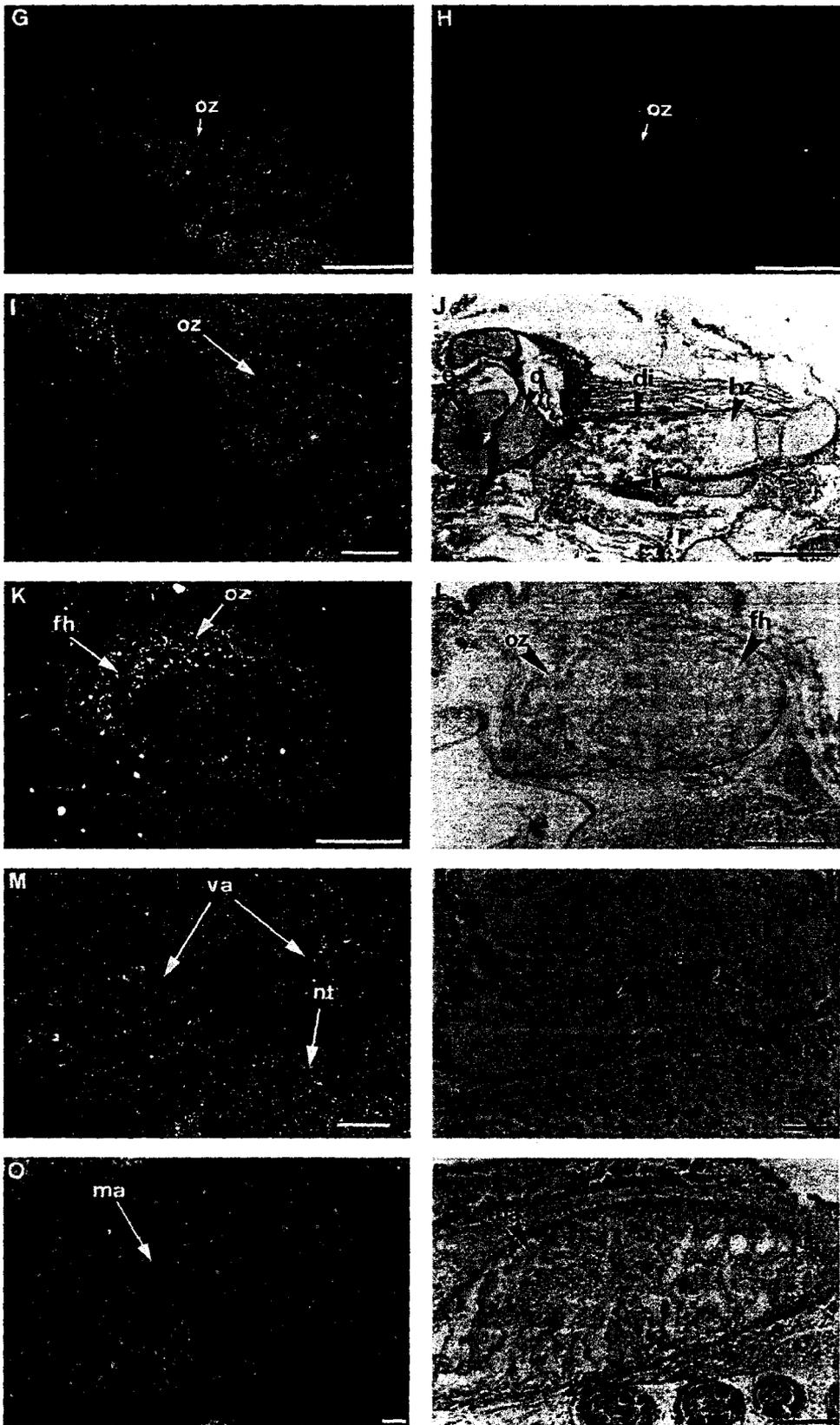


Fig. 1. Continued.

the steroidogenic cascade (Ref. 4 and references therein).

Two orphan receptors, estrogen-related receptor-1 (ERR-1) and ERR-2 (5), were identified by low-stringency screening of cDNA libraries with a probe encompassing the DNA-binding domain of the human estrogen receptor (ER). Sequence alignment of ERR-1, ERR-2, and ER reveals a high similarity (68%) in the 66 amino acids of the DNA-binding domain. The putative ligand-binding domain, positioned between amino acids 295 and 521 of ERR-1, shows 63% identity when compared with ERR-2 and 36% to the ER. Analysis of the tissue distribution of these two orphan receptors in adult mice showed that ERR-2 is expressed at lower levels and in a more restricted pattern than ERR-1. Recently, it was shown that ERR-2 is expressed during the early stages of mouse chorion formation (6). In contrast, ERR-1 appears to be widely distributed although more abundant in the central nervous system (5). ERR-1 has been identified as a regulator of the SV40 major late promoter during the early-to-late switch of expression (7). Yang *et al.* (8) also recently showed that ERR-1 modulates the activating effect of estrogens on the lactoferrin promoter and suggested that ERR-1 may interact with ER through protein-protein interactions.

To search for a possible physiological role for ERR-1, we analyzed its expression during mouse embryonic development by *in situ* hybridization. Among complex expression patterns that will be published elsewhere (Bonnelye E., Vanacker J.-M., Spruyt N., Alric S., Fournier B., Desbiens X., and Laudet V., submitted), a striking relationship was noted between ERR-1 and skeleton formation. In this paper, we report our findings that ERR-1 mRNA is detected in ossification sites of the developing mouse embryo. In parallel, we show that ERR-1 is highly expressed in both human primary osteoblastic cells and osteosarcoma cell lines. Because little is known about the mechanisms of action of ERR-1, we have examined its transactivation functions. Our data demonstrate that ERR-1 binds to the SFRE (SF1-responsive element; TCAAGGTCA; Refs. 9 and 10) motif as a monomer and acts through this sequence as a transcriptional activator. The latter property is cell-type specific and occurs in osteoblastic cells among other cell lines. Seven SFRE-like sequences are present in the promoter of the gene encoding mouse osteopontin (OPN), a noncollagenous protein released in the bone matrix by osteoblasts and believed to play an important role in the formation and remodeling of bone tissues (11). By cotransfection experiments in rat osteosarcoma cells, we show that the OPN promoter is positively regulated by ERR-1. Taken together, our data suggest an important transcriptional regulatory role of the orphan receptor ERR-1 in bone metabolism.

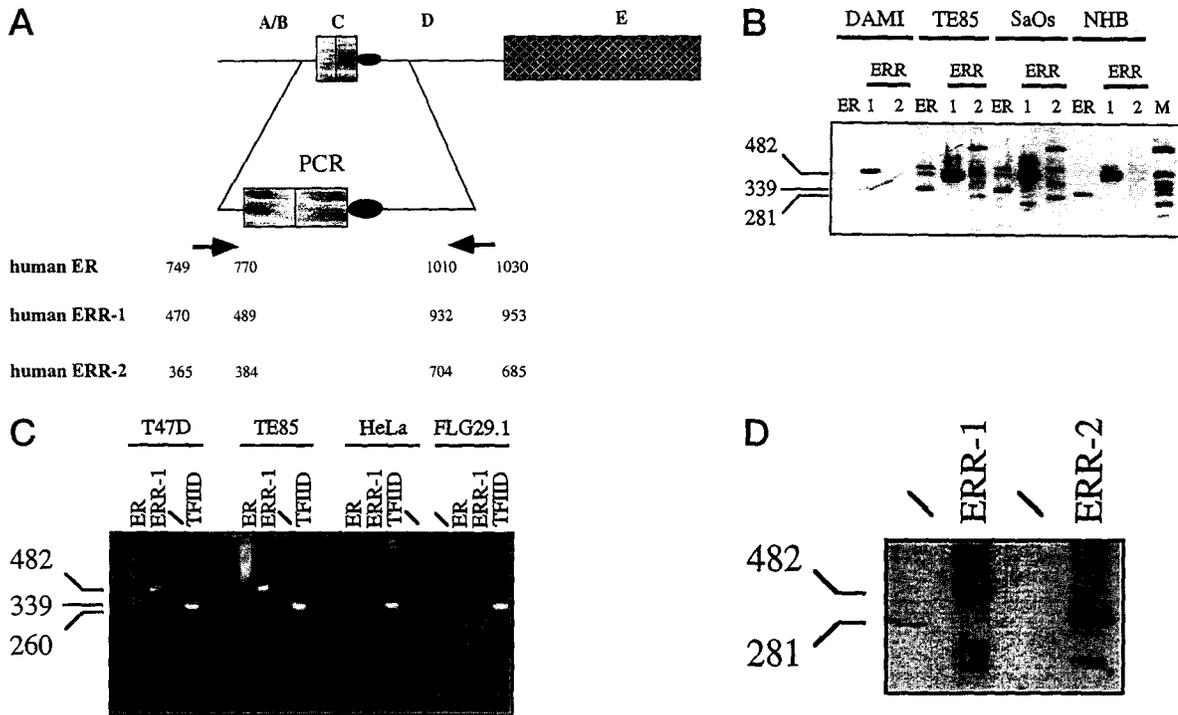
## RESULTS

### ERR-1 is Expressed *in Vivo* during Bone Development

Formation of bone during embryonic skeletal development is an organized and well regulated process that involves differentiation of uncommitted mesenchymal progenitor cells to osteoblasts. In the case of membranous ossification, a process used in generating the flat bones of the skull (*i.e.* membrane bones), as well as in adding bone to the outer surfaces of long bones, the mesenchymal cells differentiate directly into bone-forming osteoblasts. In contrast, in long bone and vertebrae (*i.e.* cartilaginous bones) endochondral bone formation takes place by the progressive substitution of cartilage by bone.

With respect to bones formed by endochondral ossification, ERR-1 was detected by *in situ* hybridization in forelimb bones such as the ulna, radius, and humerus at E17.5 (u, r, and h, respectively, in Fig. 1A). This expression is specific since no signal was seen with the sense probe (Fig. 1F). As shown by picro-indigo-carmin labeling, which stains the ossification centers in brown and the cartilage in blue, ERR-1 expression is restricted to the bone in the midshaft and is not found in any zone of cartilage including the hypertrophic zone (compare Fig. 1A and Fig. 1B). At higher magnification of the ulna, the specificity of ERR-1 for the bone [ossification zone (oz) in Fig. 1, C, D, and E] but not hypertrophic cartilage, is clear.

In E17.5 mice, we observed ERR-1 expression only in long bones in which bone centers were established around E15. We thus performed *in situ* hybridization on E15.5 embryos to see whether ERR-1 expression coincides with the establishment of the first ossification centers. At E15.5, we observed the appearance of some ossification zones in our sections of ribs and vertebrae. In these ossification centers, ERR-1 expression began to be detected (data not shown). Taken together, these data indicate a spatial and temporal correlation between ERR-1 expression and the formation of the ossification zone. Consistent with this conclusion, we observed ERR-1 expression during ossification of the cartilage primordia of the upper-shaft region of the humerus (oz in Fig. 1, K and L), in the hindlimb (femur; Fig. 1, G, H, and I), and in the vertebrae (see va in Fig. 1, M and N). Restriction of ERR-1 transcripts to areas of bone is clear when the *in situ* hybridization is compared with the picro-indigo-carmin histochemistry (oz in Fig. 1, G-J). ERR-1 hybridization is exclusively localized to bone in the midshaft (diaphyses) and is not present in the cartilaginous epiphyses. Notably, ERR-1 transcripts are also detected in the ossification centers of the ribs at the same stage (not shown). To confirm that ERR-1 is not expressed in cartilage cells, E11 limb bud cells were cultured for 24 or 96 h and then analyzed by *in situ* hybridization. ERR-1 expression was not observed at



**Fig. 2.** Expression of ER, ERR-1, and ERR-2

A, Scheme of the RT-PCR strategy. The domain organization of nuclear receptors is shown. Numbers indicate the nucleotide position of the ends of each primer used. B, C, and D, RT-PCR experiments. mRNA from the cell lines indicated (B and C) and ES cells (D) were reverse transcribed and amplified with primers specific for ER, ERR-1, ERR-2, or TFIIID as stated. Reactions were run on a native gel. Values on the left indicate the expected size of the amplification products of ERR-1 (482 bp), ER (339 bp), ERR-2 (281 bp), and TFIIID (260 bp). M, Marker lane. Slash bars indicate PCR reactions performed in the absence of RNA as negative control.

either time point, although cartilage nodules were clearly present by 96 h.

Notably, ERR-1 was also expressed in bones formed by intramembraneous ossification, e.g. strong signal was seen in the maxillary bones of the face (see ma in Fig. 1, O and P). Thus, ERR-1 mRNA levels are high in all ossification centers during both intramembraneous and endochondral bone formation.

**ERR-1 Is Expressed in Human Osteoblastic Cells**

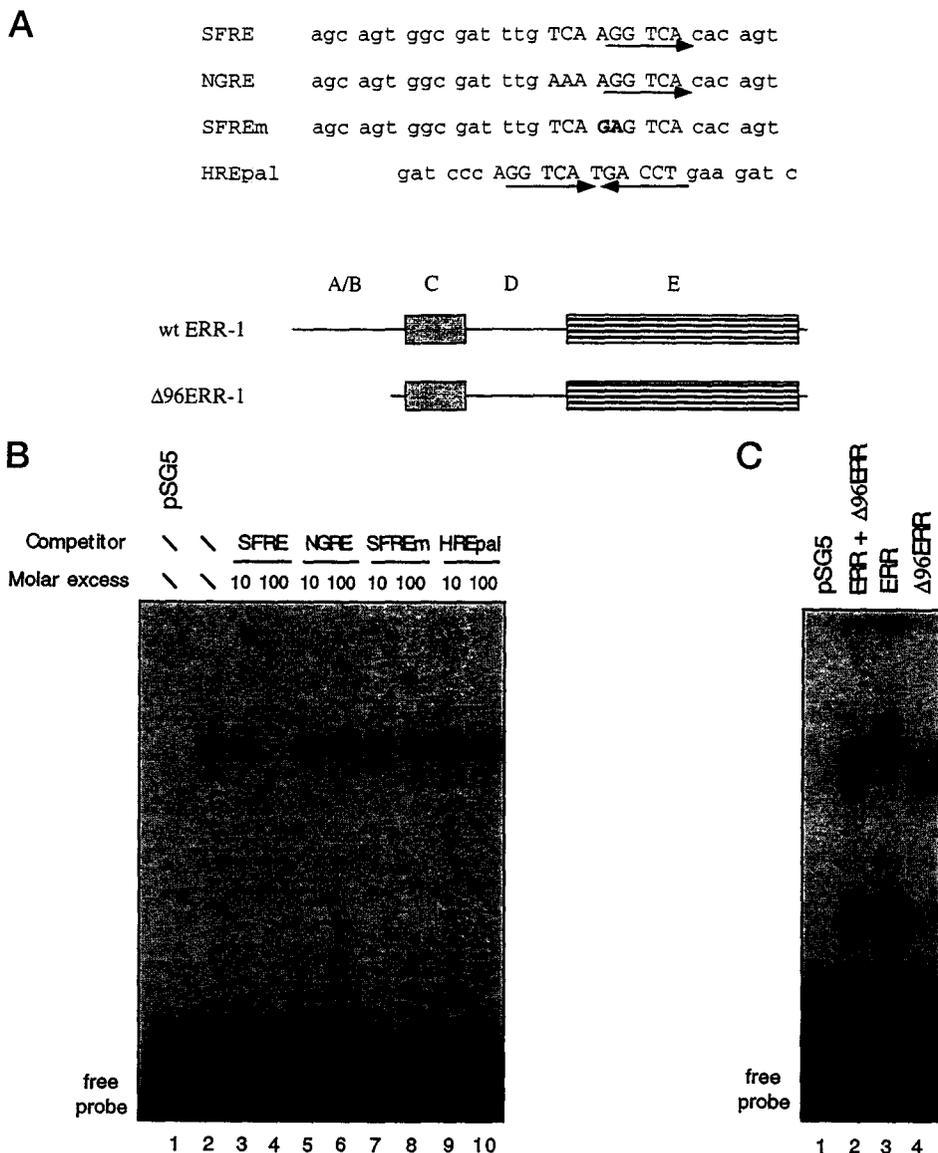
The expression of ERR-1 during *in vivo* bone development led us to investigate the presence of its mRNA in cultured bone-derived cells. Since the process of ossification involves many cell populations that cannot be easily distinguished by *in situ* hybridization, such an experiment may also provide a first discrimination of the cell type displaying ERR-1 expression. We performed RT-PCR experiments with primers designed to amplify separately the three ER-related mRNAs: ERR-1, ERR-2, and ER itself (Fig. 2A). Figure 2B shows that ER is expressed in osteoblastic cell lines SaOs, TE85, and primary human osteoblastic populations (NHB), but not in DAMI platelet cells, as expected. To address further the specificity of ERR-1 for osteoblastic cells, we screened other nonosteoblastic cells us-

ing TFIIID as a positive control. Consistent with our observation that ERR-1 is expressed in the developing mammary gland (Bonnelye *et al.*, submitted), T47D (a mammary carcinoma cell line) cells contain ERR-1 and a weak amount of ER (Fig. 2C). On the contrary, HeLa- and FLG 29.1 cells [a human leukemic line that exhibits osteoclastic differentiation markers upon TPA treatment (12)] are devoid of ERR-1 mRNA.

As expected from the earlier observations of a restricted pattern of expression in adult (5, 6), ERR-2 was not detected in any of the cells tested except in the positive control embryonic stem (ES) cells (Fig. 2D). In agreement with the data published by Peterson *et al.* (6), we found that these cells express ERR-2. ERR-1 is also present in ES cells, suggesting an early onset of its expression in the developing embryo. Taken together, the detection of ERR-1 mRNA in cultured cells is consistent with its expression *in vivo*, in particular in bone-derived populations where it appears to be restricted to osteoblastic cells.

**ERR-1 binds to DNA as a Monomer on the SFRE Element**

As a first step toward understanding the molecular effects of the ERR-1 gene, we determined the DNA

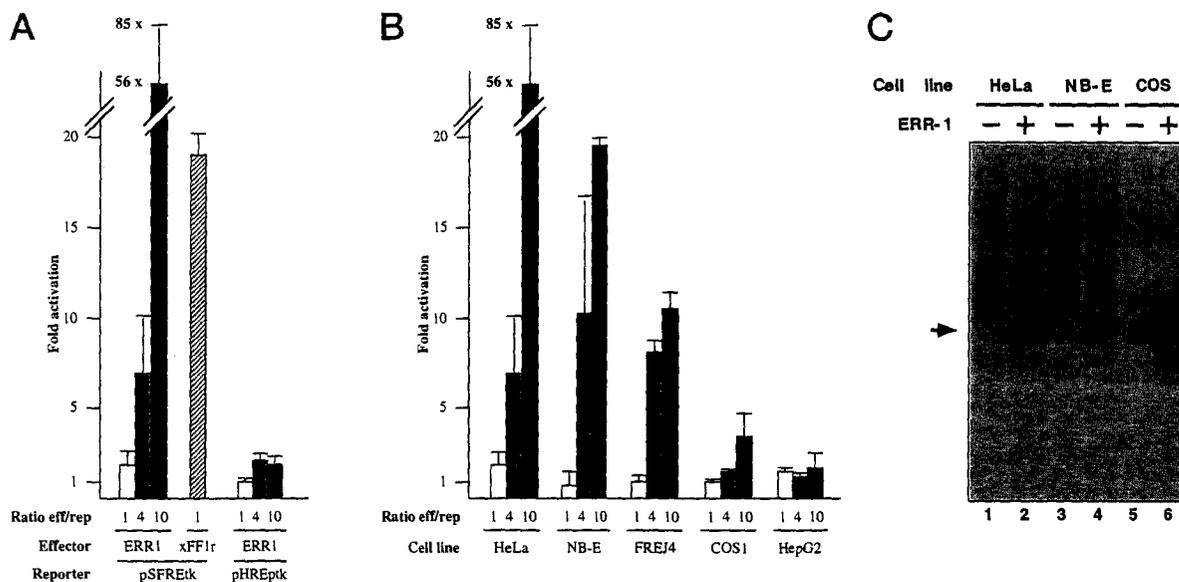


**Fig. 3. Binding Specificity of ERR-1**

A, Sequences of the products used in binding experiments. The upper panel describes the oligonucleotides. Core responsive element is *underlined* by an arrow. The consensus site in each oligonucleotide is in *capital letters*. Mutated nucleotides in SFREm are in *boldface*. The lower panel schematizes the ERR-1 derivatives used in Fig. 3C. B, Competition EMSA. ERR-1 protein was *in vitro* synthesized and allowed to bind on a SFRE probe. Where stated, unlabeled oligonucleotides were added at the indicated molar excesses. Lane 1: unprogrammed (empty pSG5 vector) reticulocyte. Unbound probe is indicated ("free probe"). C, Monomer binding of ERR-1. Indicated proteins were *in vitro* synthesized and allowed to bind to a SFRE probe as stated. Lane 1: unprogrammed (empty pSG5 vector) reticulocyte lysate. Unbound probe is indicated ("free probe").

target of its product. ERR-1, like all members of the nuclear receptor superfamily, can be expected to bind to specific DNA sequences that contain the general core responsive element (AGGTCA). Electrophoretic mobility shift analyses (EMSA) were performed using *in vitro* translated ERR-1 product and various synthetic oligonucleotides containing the core element as probes. These included palindromic sequences (HREpal, see Fig. 3A, and estrogen responsive element), direct repeats motifs [response elements to the thyroid hormone-, the vitamin D<sub>3</sub>- or the retinoic acid receptor,

see Glass (13) for a review], or monomeric half-sites (response elements to Rev-erb, SF-1, or NGF1B) in the presence or absence of unlabeled oligonucleotides as competitors (Fig. 3 and data not shown). We found that ERR-1 specifically binds to the SFRE probe (SF1/FTZ-F1 responsive element; TCAAGGTCA; Refs. 9 and 10), as illustrated in Fig. 3B. ERR-1-programmed reticulocyte lysate (lane 2) but not unprogrammed lysate (lane 1) forms a single retarded complex with a SFRE probe. The recognition was specific since complex formation was inhibited by an excess of unlabeled



**Fig. 4.** Transactivation by ERR-1

Cells were cotransfected with 0.5  $\mu$ g reporter plasmid, together with the indicated molar excess of effector plasmid. CAT activities were determined 48 h after transfection and are plotted relative to the effector-free sample. *Graphs* represent the average of at least three independent experiments, with error bars indicating the internal variation. **A**, Target specificity of ERR-1 response. HeLa cells were cotransfected with pSFREtk or pHREptk (containing pentamers of SFRE and HREpal sites, respectively; see sequences on Fig. 3A), together with ERR-1 or FTZ-F1(xFF1r)-encoding plasmid, as indicated. **B**, Cell specificity of ERR-1 response. Indicated cells were cotransfected with pSFREtk together with ERR-1-encoding plasmid. **C**, Control of ERR-1 expression. Indicated cells were transfected with 5  $\mu$ g plasmid pSG5 ERR-1 (*even* lanes) or wt pSG5 (*odd* lanes). Forty eight hours after transfection, whole cell extracts were performed. Equal amounts of proteins were allowed to bind on a SFRE probe. *Arrow* indicates SFRE-protein complex, appearing in ERR-1-transfected cells.

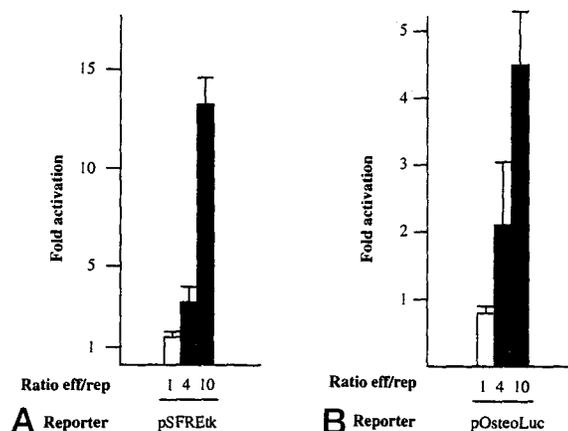
homologous- (SFRE; lanes 3 and 4), but not of related but distinct oligonucleotides (lanes 5 to 10; sequences in Fig. 3A). Other receptors have been described to bind to a single element (e.g. SF-1/FTZ-F1, NGF1B, Rev-erb . . . ; see Refs. 13 and 14 and references therein). The sequence immediately 5' of the core element is, in this case, assumed to mediate the specificity of binding of each type of receptor (9, 13). We therefore assayed the requirement of ERR-1 toward the nucleotides present upstream of the core element (Fig. 3b). Addition of excesses of NGRE (NGF1B responsive element; Ref. 9; lanes 5 and 6) or of the RevRE (Rev-erb responsive element; Refs. 15 and 16 and data not shown) to the binding reaction did not affect the fixation of ERR-1 on the SFRE. Mutations inside the core element (as present in competitor SFREm; lanes 7 and 8) impaired the ability to compete. Finally, the palindromic hormone responsive element (HREpal; lanes 9 and 10) did not interfere with ERR-1 binding. The formation of the ERR-1-SFRE complex is thus strikingly dependent upon the integrity of the TCA sequence located 5' of the core element.

Monomer vs. dimer binding is a key question in the mechanism of action of orphan receptors. To address this problem in the case of ERR-1, deletion of 96 amino acids of its A/B domain (which is dispensable for DNA binding) was performed by PCR (schematized on Fig. 3A). The resulting construct

( $\Delta$ 96ERR-1) was (after sequencing) *in vitro* translated and used in EMSA (Fig. 3C).  $\Delta$ 96ERR-1 forms a complex with SFRE that migrates faster than wild type (wt) ERR-1-SFRE. Combination of wt ERR-1 and  $\Delta$ 96ERR-1 in the binding reaction produces two distinct complexes and no intermediary one, which would be expected in the case of dimer binding. ERR-1 is thus a new example of monomer binding orphan receptor.

#### Transcriptional Activity of ERR-1

As the ERR-1 gene product binds to a specific DNA sequence, we have tested its ability to regulate transcription. To this end, SFRE oligonucleotides were cloned as pentamers in front of the HSVtk promoter and a chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene. After sequencing, resulting constructs were cotransfected in HeLa cells with varying amounts of pSGERR-1 plasmid (Fig. 4A). Reporter gene expression from pSFREtk was enhanced in a dose-dependent manner by cotransfection of ERR-1-encoding plasmid. As a positive control, the FTZ-F1 group member xFF1r acts through the same sequence. It should be noted that a high (10-fold) reporter-effector ratio was required to reach a maximal effect. Stimulation by ERR-1 requires the presence of SFRE sites in the plasmid, since no transactivation was observed with



**Fig. 5.** Transcriptional Activity of ERR-1 in ROS 17.2/8 Cells  
Cells were cotransfected with 0.5  $\mu$ g reporter plasmid, together with the indicated molar excess of effector plasmid. Reporter activities were determined 48 h after transfection and are plotted relative to the effector-free sample. *Graphs* represent the average of at least three independent experiments, with error bars indicating the internal variation. **A**, Activity of ERR-1 on SFRE-supplemented minimal promoter. CAT activity is used as a reporter. **B**, Activity of ERR-1 on osteopontin gene promoter. The region spanning nucleotides -882 to +79 (relative to the transcription start site and described in Ref. 20), cloned in front of the Luc reporter gene was used in this study.

the minimal promoter supplemented with the nonbinding HREpal sequence (plasmid pHREptk). We also tested the ability of several other cell lines to support ERR-1-induced transactivation. As shown in Fig. 4B, ERR-1 exerts a pleiotropic activity, ranging from high (HeLa cells) to low or no (simian COS1, human HepG2 cell) stimulation capacity. Human NB-E and rat FREJ4 cell lines supported ERR-1 transactivation to an intermediate level. This phenomenon cannot be interpreted in terms of differences of expression of the transfected ERR-1 in the various cell lines as verified by EMSA and exemplified in Fig. 4C. Transfection of ERR-1 in HeLa cells (lane 2) resulted in a SFRE-protein complex that was undetectable in mock-transfected cells (lane 1). This complex arose in comparable amounts when NB-E (lane 4) or COS cells (lane 6) were transfected even though the latter cells already express endogenous ERR-1 (see lane 5). We therefore conclude that the transcription activation potential of ERR-1 exhibits strong cell type specificity.

#### Activities of ERR-1 in Osteoblastic Cells

Because ERR-1 is expressed *in vivo* during bone formation and regulates transcription in a cell-specific manner, we addressed the question of its activity in bone cells. Interestingly, we found that ERR-1 is a functional transcription factor in the rat osteosarcoma cell line Ros 17.2/8. Increasing the expression of ERR-1 in these bone cells led to an

enhanced (up to 12-fold) expression of the CAT gene cloned in the pSFREtk plasmid (Fig. 5A). Again, no effect of ERR-1 was observed on the pHREtk vector (data not shown).

Bone cells express a number of differentiation markers (see Refs. 17 and 18 for a review), the expression of some being temporally regulated during the process of ossification. In search of a potential molecular target for the transcription activator ERR-1, we screened the published promoters of bone-associated genes for the presence of SFRE sites. Computer-assisted analysis of the mouse osteopontin (OPN) promoter (19, 20) revealed the presence of seven SFRE-like motifs (bearing one or two nucleotide differences with the consensus SFRE). OPN is a noncollagenous protein expressed by osteoblastic cells and released in the bone matrix. To determine the effect of ERR-1 on this promoter, cotransfections were performed in rat osteosarcoma Ros 17.2/8 cells. Figure 5B shows that ERR-1 positively regulates the OPN promoter in a dose-dependent manner, thus suggesting a physiological relevance of ERR-1 expression in bone cells.

## DISCUSSION

### ERR-1 and Bone Formation

*In situ* hybridization of mouse embryo sections reveals a temporal and spatial correlation between the presence of ERR-1 mRNA and the process of ossification. Bone formation and patterning require several cell types, including bone-forming osteoblasts and bone-degrading osteoclasts. Consistent with the *in situ* hybridization data, the RT-PCR results presented here clearly show that ERR-1 is expressed by osteoblastic cell lines and cell populations derived from normal human bone that contains a high percentage of osteoblasts. Furthermore, the presence of ERR-1 mRNA could not be detected in the osteoclast-like FLG 29.1 cell line, suggesting that ERR-1 is, among bone-derived cells, osteoblast-specific. Although not restricted to bone (Ref. 5; Bonnelye *et al.*, submitted; and our results presented here), the pattern of ERR-1 expression suggests that this receptor may play a role in the formation of both endochondral and intramembranous bones. Study of the osteoblast lineage has been hampered by a relative lack of markers as summarized by Aubin and colleagues (17, 18). The potential of ERR-1 as a regulator and as a new marker of the osteoblast lineage and its use together with already defined osteoblastic markers such as alkaline phosphatase, collagen type I, bone sialoprotein, and osteocalcin may contribute to a better understanding of the stage of differentiation of the osteoblastic cells during both intramembranous and endochondral ossification.

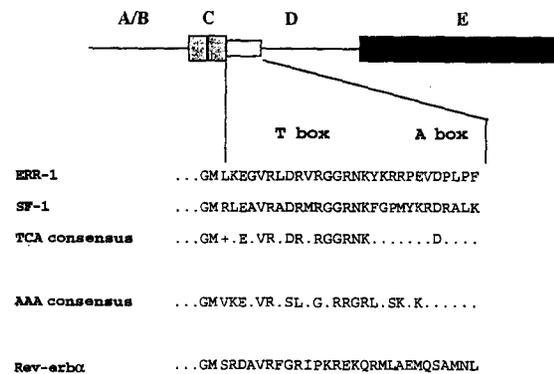
Bone formation and turnover are known to be under the control of many hormones and cytokines, among which estrogens play a critical role, as exemplified by the

accelerated bone loss leading to osteoporosis at menopause. The low concentration of ER in osteoblasts (200–1000 molecules per cell; Refs. 21–23) relative to reproductive tissues (10000–100000 molecules per target cell) is consistent with the hormone having a more limited number of direct actions on the skeleton. It is rather commonly believed that most of the known effects of estrogens in bone may be mediated by the action of specific growth factors and cytokines (24, 25). It is also possible that ERR-1 plays a role in this complex series of events by regulating estrogen response. Interestingly, the level of mRNA expression of ERR-1 is much higher than of ER, as determined both by RT-PCR (Fig. 2) and *in situ* hybridization experiments (not shown). Whether this reflects the amount of protein available inside the cells remains to be established. A detailed study of the level of ER and ERR-1 mRNA and proteins during bone differentiation is therefore of particular importance in this context. Although highly related to the ER, ERR-1 is unlikely to bind estrogen, since its transcriptional activity seems to be ligand-independent (see below). In this respect, an indirect regulatory pathway seems likely, consistent with the *in vitro* demonstration of a physical interaction between ER and ERR-1 and the suggestion that, in given promoter contexts, ERR-1 may enhance the transcriptional effects of ER (8). The two factors could thus regulate overlapping gene networks. Whether such an effect takes place in osteoblastic cells constitutes an interesting possibility that remains to be addressed. This awaits the identification of common target genes of ER and ERR-1, expressed during bone formation (e.g. in osteoblasts).

Osteoblasts are very active cells that synthesize many different products as type I collagen (26), osteocalcin (27), osteopontin (28) and bone sialoprotein (29, 30). Any of these genes could be candidates for ERR-1 target genes. Indeed, we found that the osteopontin promoter, which contains seven SFRE-like elements, positively responds to ERR-1 in transient cotransfection experiments, suggesting an *in vivo* regulation of osteopontin by ERR-1. In support of this hypothesis, there is a temporal correlation between the onset of osteopontin expression (E16; Ref. 31) and ERR-1 (E15.5). Taken together with our expression data, these results suggest that ERR-1 may play a key role in bone development. This could be achieved through direct promoter regulation and/or by interference with the estrogen-controlled pathway, through interaction with ER.

#### Relations of ERR-1 with Other Nuclear Receptors

The SFRE motif was first described as the response element of the members of the SF1/FTZ-F1 subfamily of nuclear receptors. These orphan receptors bind to DNA as monomers, and it has been demonstrated that, when they do so, the conserved T and A boxes (which lie downstream of the Zn-fingers) play an important role in the recognition of the 5'-extension of the core motif (9). It is interesting to note that in these critical regions, ERR-1 and SF1 harbor a high level of



**Fig. 6.** Sequence Analysis of Monomer Binding Receptors

Schematic domain organization of nuclear receptors is given, with a magnification of the T- and A-box. Sequences are given in the *one-letter-code* amino acids (a.a.). The comparison of ERR-1 and SF-1 allows the definition of a TCA consensus, where identical a.a. are shown, and periods represent variable ones. This can be compared with the same regions of AAA-binding receptors (AAA consensus, as defined in Ref. 9) and of Rev-erbα (which binds to a highly divergent sequence). +, Positively charged a.a.

sequence identity (adapted from Ref. 9 in our Fig. 6) that allow to define a TCA consensus. In contrast, these T and A boxes are divergent from those of NGF1B or Rev-erbα. This suggested that SF-1/FTZ-F1 and ERR-1 could recognize common sequences, distinct from the ones bound by NGF1B and Rev-erbα. In agreement with this, we indeed found that ERR-1 binds specifically to the SFRE motif, an interaction that is not competed by NBRE or RevRE sequences. Analysis of the T and A box sequences in the work mentioned above (9) also predicted monomer binding for ERR-1, a feature confirmed in our experiments. However, the behavior of ERR-1 in the presence of repeats of SFRE has not been investigated, and it remains possible that, as with Rev-erb on the RevDR2 elements (32), ERR-1 could homodimerize on specific direct repeats or heterodimerize with RXR as is the case for several other nuclear receptors.

The transient cotransfection experiments presented here indicate that the SFRE is sufficient to render a minimal promoter responsive to ERR-1. Transactivation by ERR-1 occurs without addition of any factor to the culture and even when cells are cultured in charcoal-stripped medium (*i.e.* steroid-devoid; data not shown). Nevertheless, this does not rule out the possibility of a ligand-activated function of ERR-1 since a ligand could be synthesized and be active inside the cell. Such an intracrine mode of action is, for example, thought to occur for the PPAR gene products that may be activated by specific ligands synthesized inside the cell from inactive precursors (33, 34). The fact that ERR-1 is able to positively regulate transcription is in agreement with the results published by Lydon *et al.* (35), who found that a PR-ERR-1 fusion protein is able to activate transcription without addition of any exogenous factor. The level of transcription stimulation achieved by ERR-1 is depen-

dent on the cell type examined. This is reminiscent of the behavior of SF1/FTZ-F1 that exert low (36) or high (10, 37) transactivation upon its cognate sequence, depending on the cell system used. This could suggest that cells in which no ERR-1-induced transactivation is observed (e.g. HepG2) lack a cofactor that is present to a large amount in HeLa cells. Cells supporting an intermediate ERR-1 stimulation (such as osteoblastic Ros cells) would, accordingly, contain intermediate levels of this factor. It may also explain the discrepancy of our work with reports of a repressive effect of ERR-1 on the SV40 major late promoter (MLP; Ref. 7). On the other hand, in the absence of any SFRE (as in the case of the SV40 MLP), other sequences might mediate a negative effect.

The behavior of ERR-1 is different from that described for its close relative ERR-2, which binds as a homodimer to the estrogen responsive element and appears to be transcriptionally inactive on this element (6). Although the result obtained for transactivation may be also explained by a cell-specific action of ERR-2, the difference in DNA binding specificities of these two strongly related factors appears provocative. ERR-1 and ERR-2 display high sequence identity in the C domain as well as the T box, whereas differences exist in the A box that might be responsible for preference toward their target DNA site. On the other hand, it is not excluded that, though binding to the ERE, ERR-2 might also recognize another sequence, such as the SFRE. Altogether, both ERRs may interconnect with ER-regulatory pathways, through DNA binding on ERE (i.e. ERR-2) or through protein interactions (i.e. ERR-1).

The action of ERR-1 through the SFRE element emphasizes the promiscuous behavior of many members of the nuclear receptor superfamily. Indeed, our study demonstrates that several unrelated groups of orphan receptors are able to bind and regulate transcription through the SFRE site. Until now, the SFRE site has been demonstrated to be a target only for members of the SF1 group. These orphan receptors are expressed in steroidogenic tissues as well as in gonads and appear to be important for the regulation of the endocrine cascade that controls gonad differentiation and sex determination. Our study extends the number of orphan receptors and tissue types for which the SFRE element is a key determinant. The expression territories of SF1 and ERR-1 are partly overlapping, but no competition or synergy in transcriptional regulation by both proteins could be observed (discussed in Bonnelye *et al.*, submitted). Nevertheless, we cannot exclude that in particular tissues or physiological situations, a cross-talk between SF1 and ERR-1-mediated transcriptional regulation may occur. Interestingly, the GCNF orphan receptor binds as a dimer to a DR0 element (38). This site harbors the TCAAGGTCA motif, and here again we cannot exclude a possible cross-talk between GCNF, ERR-1, and SF1 on given response elements.

Our results give the first hints as to the possible *in vivo* functions of the ERR-1 orphan receptor. Expression studies as well as *in vitro* experiments suggest that ERR-1 may play an important role in the formation

of the skeleton. ERR-1 could act independently and/or intervene in regulation pathways controlled by other members of the nuclear receptor superfamily. These interconnections may be necessary for the differential regulation of a given set of target genes.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells

Cells other than those of the osteoblastic lineage were grown in DMEM with 10% FCS. The clonal human osteoblast-like cell line SaOS-2 was obtained from Dr. S. Rodan (Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, West Point, PA). The human osteosarcoma cell TE-85 (ATCC, CRL 1543) was obtained from the American Type Cell Culture Collection (Rockville, MD). The ROS 17/2.8 rat osteosarcoma cell line was kindly provided by Dr. J. Fisher (University of Zurich). FLG-29.1 cells were obtained from Dr. M. L. Brandi (University of Firenze, Italy). The cells were maintained in Hams F12/DMEM supplemented with 10% FCS. Normal human bone was obtained from orthopedic surgery and comprised cancellous bone from the tibial head of a 27-yr-old woman and subsequently cultured. Briefly, the trabecular bone was minced, and incubated with 250 U/ml collagenase (type IV) in medium lacking serum, and the resultant bone chips were cultured in low calcium medium (CaCl<sub>2</sub>-free DMEM) containing 10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin-streptomycin, and 50 µg/ml ascorbate.

### RT-PCR

Total RNA was extracted from confluent cells using the Quia-gen kit for total RNA preparation from cell cultures (Quiagen, Chatsworth, CA). Samples of total cellular RNA (5 µg) were reverse-transcribed using the first strand synthesis kit of Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

PCR was performed to generate amplified fragments of ERR-1, ERR-2, and ER. The primers used, located in different exons, were as follow:

ER upstream: AGT ATG GCT ATG GAA TCT GCC A  
ER downstream: TTT CAA CAT TCT CCC TCC TCT  
ERR-1 upstream: TGG TCC AGC TCC CAC TCG CT  
ERR-1 downstream: TGA GAC ACC AGT GCA TTC ACT G  
ERR-2 upstream: TCA AGT GCG AGT ACA TGC TT  
ERR-2 downstream: GAA ATC TGT AAG CTC AGG TA  
TFIID upstream: ACA GGA GCC AAG AGT GAA GAA  
TFIID downstream: CCA GAA ACA AAA ATA AGG AGA

The PCR reaction mixture contained cDNA (10 µl), 2 µl dNTP mix (10 mM), 1× PCR buffer with Mg<sup>++</sup>, 20 pmol primers and 5 U of *Taq* polymerase from Boehringer (Mannheim, Germany). Reactions were carried out in a PCR apparatus Master cycle 5330 plus from Eppendorf. One PCR cycle consisted of denaturation for 30 sec (94 C), annealing for 30 sec (60 C), and extension for 30 sec (72 C). Each PCR reaction consisted of 30 cycles.

### *In Situ* Hybridization

E11, E15.5, and E17.5 mouse embryos were fixed at 4 C for 16 h in 4% paraformaldehyde in PBS containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dehydrated, and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were transferred to 3-aminopropyltriethoxysilane (TESPA; Aldrich, Milwaukee, WI) coated slides and dried at 42 C for 2 days. *In situ* hybridization was performed as described (39) using <sup>35</sup>S-labeled antisense RNA probe synthesized from a full-length mouse ERR-1 cDNA cloned in Bluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA). To avoid any cross-hybridization with ERR-2 mRNA, hybridization was

performed with stringent conditions (60°C). As a negative control, adjacent sections were hybridized with a  $^{35}\text{S}$ -labeled sense RNA probe synthesized from the same template. At the end of the *in situ* hybridization protocol, nuclei were stained with bisbenzimidazole and appeared blue under fluorescent light.

### Histological Staining

The sections were treated with toluene, hydrated, and stained with Nuclear Red for 20 min. They were rinsed, stained with picric-indigo-carmin for 15 min, and rinsed with 0.3% acetic acid. Finally, the sections were dehydrated with ethanol and treated with toluene before mounting under a coverslip.

### Transfections

Transient transfections were performed according to the calcium phosphate precipitation method (40), using plasmid pSG5 as a carrier up to 6  $\mu\text{g}$  of total DNA per sample. Cells were collected 48 h after transfection. CAT activities were determined and normalized to the total amount of protein present in the cell lysates.

ROS17/2.8 cells were plated at 50% confluency in Hams F12/Dulbecco MEM in 100-mm plates. At 80% confluence DNA-mediated gene transfer was performed using lipofectamine from GIBCO-BRL (Basel, Switzerland). Transfection time was 4 h and total DNA amount of 8  $\mu\text{g}$  consisted of the reporter plasmid (pSFRE $tk$ ) with respectively 4- and 10-fold ERR-1 expression vector. One microgram of pCMV  $\beta$ -gal expression vector was used as an internal control for transfection efficiency. The cells were then cultured for another 48 h and harvested, and CAT activity was analyzed in cell extracts (prepared by three freeze-thaw cycles) using a procedure described previously (Gorman *et al.*, 1982). Samples were run for 1 h on TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany), and radioactivity was measured by a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).  $\beta$ -Galactosidase was determined in cell extracts using the Promega kit based on a technique described by Rosenthal (42). CAT enzyme results are normalized by  $\beta$ -galactosidase activity.

### Plasmid Constructions

Mouse ERR-1 cDNA (a generous gift of Vincent Giguère) was subcloned in the *EcoRI* site of plasmid pSG5. To clone HRE sequences upstream from the minimal *tk* promoter, synthetic oligonucleotides containing SFRE or HREpal sites (see sequences on Fig. 3A) and flanked by *Bam*HI and *Bgl*II sites were phosphorylated and ligated. Pentamers were isolated in 5% polyacrylamide gel and inserted into the *Bam*HI site of plasmid pBL Cat5 (43). For plasmid  $\Delta$ 96ERR-1, PCR was performed with specific oligonucleotides. The resulting fragment was sequenced and then reinserted in pSG5 plasmid.

### Electrophoretic Mobility Shift Assays

Probes were labeled with T4 polynucleotide kinase in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP. *In vitro* translations were performed using the TNT kit (Promega, Madison, WI) and pSG5 either wild type (unprogrammed) or directing ERR-1 derivatives expression. Binding reactions were performed as described (44), using 2  $\mu\text{l}$  of translation reaction.

### Acknowledgements

The authors are indebted to Katja Sucker for technical help. pOPN-Luc plasmid was constructed by Xiaojia Guo. We thank Dominique Stéhelin for support, Vincent Giguère for

ERR-1 expression vector and sharing unpublished results, and Christine Dreyer for xFF1r expression vector. Nicole Devassine and Marie-Christine Bouchez performed excellent secretarial assistance.

Received July 8, 1996. Revision received February 28, 1997. Accepted March 19, 1997.

Address requests for reprints to: Vincent Laudet, Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, Endocrin Group CNRS URA 1160, 1 Rue Calmette, Lille Cedex, France 92521.

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Centre Nationale Recherche Scientifique, and Institut Pasteur de Lille. E.B. is supported by a grant from ARC. J.E.A. is funded by MRC of Canada (Grant MT12380).

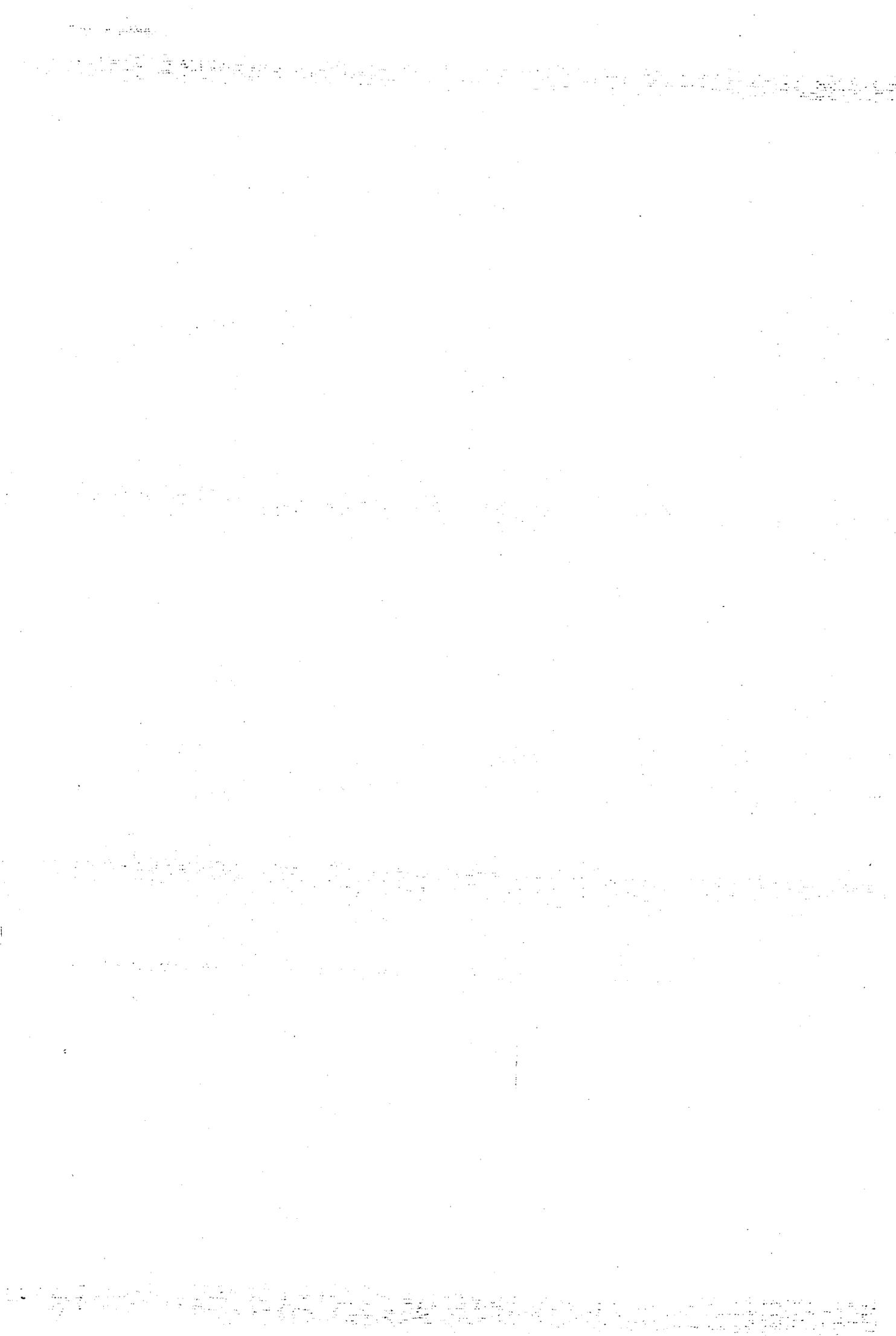
\*Equal first authors

### REFERENCES

- Mangelsdorf DJ, Evans RM 1995 The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850
- Gronemeyer H, Laudet V 1995 Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2:1173-1308
- Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D 1992 Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11:1003-1013
- Parker KL, Schimmer BP. 1996. The roles of the nuclear receptor Steroidogenic Factor 1 in endocrine differentiation and development. *Trends Endocrinol Metab* 7:203-207
- Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM 1988 Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331:91-94
- Pettersson K, Svensson K, Mattsson R, Carlsson B, Ohlsson R, Berkenstam A 1996 Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54:211-213
- Wiley SR, Kraus RJ, Zuo F, Murray EE, Loritz K, Mertz JE 1993 SV40 early-to-late switch involves titration of cellular transcriptional repressors. *Genes Dev* 7:2206-2219
- Yang N, Shigeta H, Shi H, Teng CT 1996 Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem* 271:5795-5804
- Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J 1993 The orphan receptors NGF-1B and Steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 13:5794-5804
- Ellinger-Ziegelbauer H, Hlhi AK, Laudet V, Keller H, Wahli W, Dreyer C 1994 FTZ-F1 related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis. *Mol Cell Biol* 14:2786-2797
- Denhardt DT, Guo X 1993 Osteopontin - a protein of many functions. *FASEB J* 7:1475-1482
- Gattei V, Bernabei PA, Pinto A, Bezzini R, Ringressi A, Formigli L, Tanini A, Attadia V, Brandi ML. 1992. Phorbol ester induced osteoclast-like differentiation of a novel human leukemic cell line (FLG 29.1). *J Cell Biol* 1165:437-447
- Glass CK 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407
- Laudet V, Adelmant G 1995 Nuclear receptors: lonesome orphan. *Curr Biol* 5:124-127
- Harding HP, Lazar MA 1993 The orphan receptor Rev-erbA $\alpha$  activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* 13:3113-3121
- Bonnelye E, Vanacker JM, Desbiens X, Bègue A, Stéhelin D, Laudet V 1994 Rev-erb $\beta$ : a new member of the nuclear hormone receptor superfamily is expressed in nervous

- system during chicken development. *Cell Growth Diff* 5:1357-1365
17. Aubin J E, Kursad T, Heersche J 1993 Osteoblastic cell lineage. In: Noda M (ed) *Cellular and Molecular Biology of Bone*. New York, Academic Press, New York, pp 1-45
  18. Aubin JE, Liu F 1996 The osteoblast lineage. In: Raisz LG, Rodan GA, Bilezikian JP (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp 51-67
  19. Craig AM, Denhardt DT. 1993. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction *in vivo* by estrogen and progesterone. *Gene* 100:163-171
  20. Guo X, Zhang YP, Mitchell DA, Denhardt DT, Chambers AF 1995 Identification of a ras-activated enhancer in the mouse osteopontin promoter and its interaction with a putative ETS-related transcription factor whose activity correlates with the metastatic potential of the cell. *Mol Cell Biol* 15:476-487
  21. Komm BS, Terüening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR 1988 Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcome cells. *Science* 241:81-84
  22. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL 1988 Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241:84-86
  23. Ciocca DR, Roig LMV. 1995 Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16:35-62
  24. Horowitz MC 1993 Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260:626-627
  25. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC 1994 Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 15:275-300
  26. Leblond CP 1989 Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue bone and dentin. *Anat Rec* 224:2193-2197
  27. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM 1989 Osteocalcin and matrix gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69:990-1046
  28. Butler WT 1989 The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23:123-136
  29. Sodek J, Chen, JK, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, McKee MD, Nanci A 1992a Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In: Slavkin H, Price P (eds) *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 297-306
  30. Sodek J, Chen JK, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, Shapiro HS, Wrana JL, Goldberg HA 1992b Sialoproteins in bone remodelling. In: Davidovitch Z (ed) *The Biological Mechanisms of Tooth Movement and Craniofacial Adaptation*. EBSCO Media, Birmingham, AL, pp 127-136
  31. Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, Wetterwald A 1996 Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 19:371-380
  32. Adelmant G, Bègue A, Stéhelin D, Laudet V 1996 A functional Rev-erba responsive element located in the human Rev-erba promoter mediates a repressing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3553-3558
  33. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM 1995 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* 83:803-812
  34. Kliewer SA, Lenhard JM, Wilson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM 1995 A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819
  35. Lydon JP, Power RF, Conneely OM 1992 Differential modes of activation define orphan subclass within the steroid/thyroid receptor superfamily. *Gene Expr* 2:273-283
  36. Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima MK, Omura T 1993 Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268:7494-7502
  37. Lynch JP, Lala DS, Luo W, Parker KL, White BA 1993 Steroidogenic factor 1, an orphan receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 7:776-786
  38. Chen F, Cooney AJ, Wang Y, Law SW, O'Malley BW 1994 Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol* 8:1434-1444
  39. Quéva C, Ness, SA, Grässer, FA Graf, T, Vandembunder B, Stéhelin, D 1992 Expression pattern of *c-myb* and *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* 114:125-133
  40. Chen C, Okoyama H 1987 High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752
  41. Gorman CM, Moffatt LF, Howard BH 1982 Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2:1044-1051
  42. Rosenthal N 1987 Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods Enzymol* 152:704-720
  43. Boshart, Klüppel M, Schmidt A, Shutz G, Luckow G 1992 Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* 110:123-130
  44. Vanacker JM, Laudet V, Adelmant G, Stéhelin D., Rommelaere J 1993 Interconnection between thyroid hormone receptor signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J Virol* 67:7668-7672





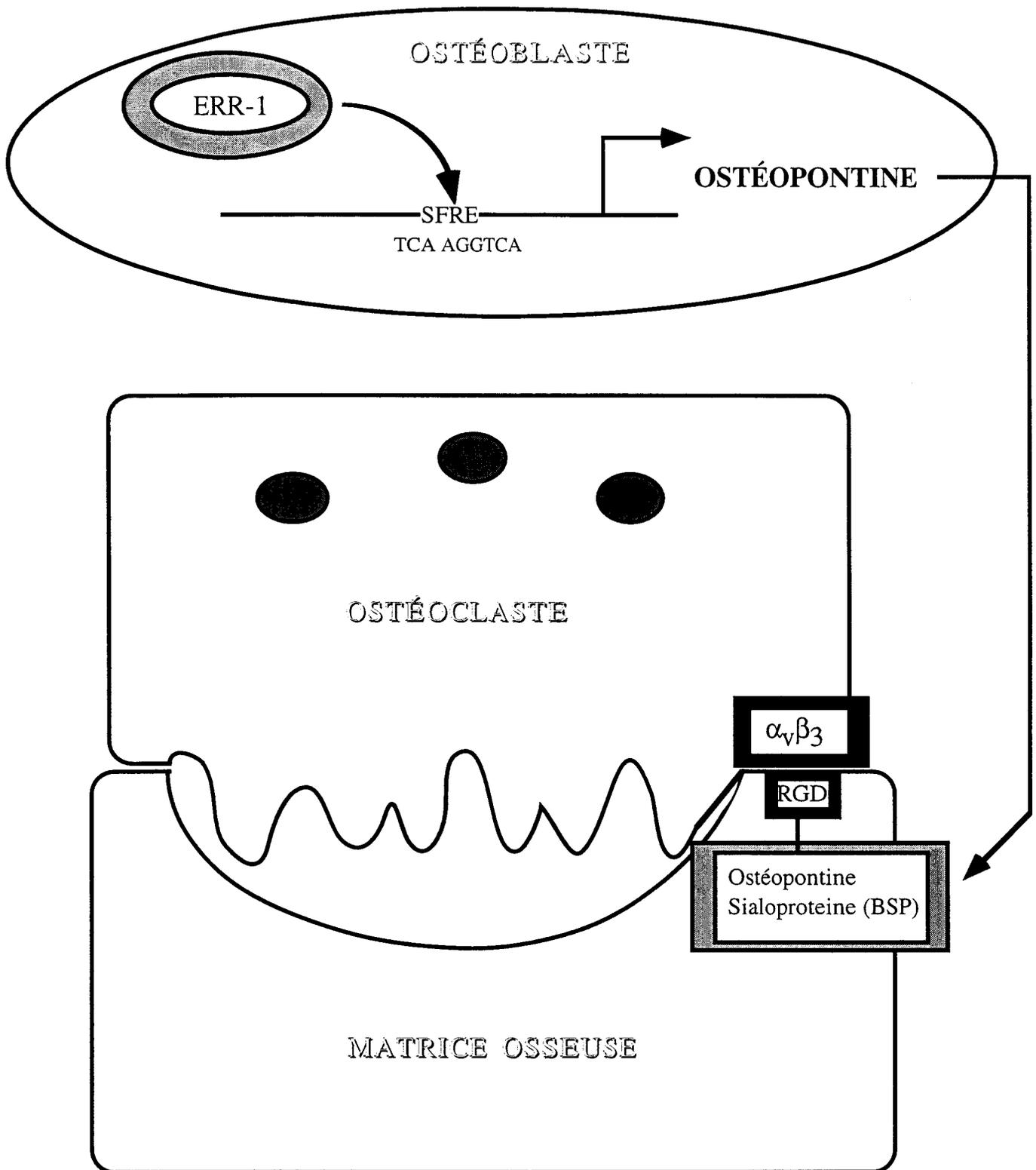
## Discussion de l'article 2

### 1) ERR-1 et la différenciation ostéoblastique.

Nous avons montré que ERR-1 était exprimé dans la zone d'ossification des os d'origine endochondrale (fémur, côtes, vertèbres) et d'origine membranaire (os maxillaire). Par RT-PCR nous avons mis en évidence l'expression de ERR-1 dans les ostéoblastes (lignées d'ostéosarcomes SaOS et TE85, et des ostéoblastes humains normaux) et pas dans la lignée FLG29.1 qui présente des caractéristiques ostéoclastiques. Dans le tissu osseux, ERR-1 pourrait donc se comporter comme un marqueur ostéoblastique et jouer un rôle dans la sa formation. Cependant pour confirmer cette hypothèse, il nous faudra préciser le profil d'expression de ERR-1.

Pour ce faire, nous allons utiliser des systèmes de différenciation *in vitro*. A l'Université de Toronto, l'équipe de Jane Aubin a développé un système de culture cellulaire mimant la différenciation osseuse. En effet, en partant de précurseurs prélevés dans des os crâniens embryonnaires de rat à E11, nous allons pouvoir cultiver ces cellules dans des conditions expérimentales définies, ce qui va permettre la formation de nodules osseux. De plus, cette équipe a aussi mis au point une méthode de « polyA-RT-PCR » permettant l'analyse au cours du temps des gènes exprimés durant la différenciation ostéoblastique chez le rat. Ainsi, la totalité des ARNm d'une cellule prélevée à un temps donné de la différenciation *in vitro* sera rétrotranscrite, amplifiée et les produits de réaction seront déposés sur un gel où ils pourront être hybridés avec des sondes choisies. Nous allons donc pouvoir déterminer le moment exact de l'apparition des messagers ERR-1 au cours de la différenciation ostéoblastique par rapport aux autres gènes exprimés dans les ostéoblastes.

En effet, s'il s'avère que ERR-1 est bien un marqueur ostéoblastique, il sera intéressant de le localiser précisément parmi les marqueurs ostéoblastiques déjà identifiés et dont l'expression peut être associée au degré de différenciation des ostéoblastes. C'est le cas (i) du collagène de type I, un des marqueurs le plus précoce de la différenciation ostéoblastique, (ii) de la BSP (pour « Bone SialoProtein ») et de l'ostéopontine qui interviennent dans l'adhérence



**Figure 48:** Attachement de l'ostéoclaste à la matrice osseuse. Cet attachement est indispensable à la résorption. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , appelée, récepteur de la vitronectine, a la possibilité de lier les protéines synthétisées par les ostéoblastes incorporées dans la matrice osseuse comme l'**ostéopontine** et la BSP. Cette adhésion passe par les séquences RGD présentes dans l'ostéopontine et la BSP et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  des ostéoclastes. (d'après Vernejoul et Marie, 1993)

des ostéoclastes à la matrice osseuse, (iii) de l'ostéocalcine qui n'est détectée qu'à la naissance dans les ostéoblastes matures et qui a la propriété de fixer le calcium (Sommer et al, 1996; Aubin et Liu, 1996). Ainsi il sera intéressant de localiser ERR-1 parmi ces marqueurs d'autant plus que ERR-1 s'exprime dans la même fenêtre temporelle que certains d'entre eux. En fait lorsque l'on compare l'expression de ERR-1 avec celle de la BSP, de l'ostéopontine ou encore de l'ostéocalcine, on se rend compte que ERR-1 est très proche du profil d'expression de l'ostéopontine que nous avons identifié comme étant un gène cible de ERR-1.

## 2) ERR-1 et l'ostéopontine.

### 2.1) Rôle de l'ostéopontine.

Comme décrit précédemment l'ostéopontine est synthétisée par les ostéoblastes. Elle est exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire et est localisée dans la matrice osseuse. Enfin elle intervient dans l'adhérence des ostéoclastes à la matrice osseuse (revue, Denhardt et Guo, 1993).

Les ostéoclastes sont des cellules très mobiles et leur attachement sur la matrice osseuse est indispensable à la résorption. C'est par l'intermédiaire de la BSP et de l'ostéopontine présentes dans la matrice osseuse que cet attachement est rendu possible. De manière plus précise, l'ostéopontine est une protéine qui contient des séquences peptidiques Arg-Gly-Asp, plus communément, appelées des séquences RGD qui interviennent directement dans l'adhérence cellulaire. De leur côté, les ostéoclastes possèdent à leur surface l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  appelée récepteur de la vitronectine. Celui-ci a la propriété d'interagir avec l'ostéopontine *via* ses séquences RGD (**figure 48**). Il en est de même pour la BSP. L'inhibition de ce contact entre ces protéines d'adhésion localisées dans la matrice osseuse et les ostéoclastes inhibe la résorption par les ostéoclastes (revue dans Vernejoul et Marie, 1993). Les processus d'adhésion et de détachement cellulaire jouent un grand rôle dans la biologie du tissu osseux. C'est par ces propriétés que l'ostéopontine suscite un grand intérêt. ERR-1, capable d'activer l'ostéopontine, pourrait donc être un régulateur du remodelage osseux.

## 2.2) Régulation de l'ostéopontine par ERR-1.

Nous avons montré que ERR-1 pouvait activer l'activité du promoteur de l'ostéopontine. ERR-1 serait donc un activateur de la transcription. Mais, il existe des désaccords concernant l'activité transcriptionnelle de ERR-1. En effet, l'équipe de Vincent Giguère, décrit ERR-1 comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle et les raisons de cette divergence ne sont pas encore claires.

En ce qui concerne l'ostéopontine, nous avons montré que ERR-1 était capable de l'activer *via* sa fixation sur un élément SFRE que Jean-Marc Vanacker dans l'équipe a récemment identifié. ERR-1 pourrait donc réguler *in vivo* l'ostéopontine au cours la formation du tissu osseux de façon précise. En effet, plusieurs arguments convergent dans ce sens.

Tout d'abord, nous avons montré que ERR-1 était capable de réguler positivement l'ostéopontine dans les cellules ostéoblastiques ROS 17.2/8, une lignée d'ostéosarcome. Nous avons aussi détecté le messager ERR-1 dans ces ostéoblastes. Or l'ostéopontine est synthétisée par les ostéoblastes ce qui suggère une co-expression de ERR-1 et de l'ostéopontine dans ces cellules. Enfin, ERR-1 et l'ostéopontine s'expriment dans la même échelle de temps dans les zones d'ossification, au cours du développement embryonnaire. En effet, ERR-1 commence à s'exprimer à E15,5 et l'ostéopontine à E16 (Bonnelye et al, 1997; Sommer et al, 1996). Ceci semble donc parfaitement corrélé avec le fait que ERR-1 puisse réguler l'expression de l'ostéopontine *in vivo*.

En conclusion ERR-1 et l'ostéopontine semblent pouvoir s'exprimer dans le même type cellulaire au même moment et ERR-1 est capable d'activer l'expression de l'ostéopontine. Ceci suggère donc que ERR-1 soit capable de réguler *in vivo* l'expression de l'ostéopontine. Maintenant il nous reste, effectivement, à montrer que ERR-1 et l'ostéopontine s'expriment dans les mêmes cellules au même stade pour pouvoir confirmer cette hypothèse. Les différents systèmes de culture *in vitro* développés par Jane Aubin pourra nous permettre d'étudier cette hypothèse.

## 2.3) Rôle de ERR-1.

ERR-1 serait donc capable de contribuer à la formation de la matrice osseuse puisqu'il est capable d'activer l'expression de l'ostéopontine. De plus ERR-1, pourrait

indirectement intervenir dans la résorption vu le rôle de l'ostéopontine dans l'adhérence des ostéoclastes à la matrice osseuse, indispensable à la résorption. On peut donc imaginer que la sur-expression de ERR-1 induise celle de l'ostéopontine, ce qui pourrait engendrer la fixation en plus grand nombre d'ostéoclastes à la matrice osseuse. Ceci aurait alors comme conséquence une augmentation de la résorption osseuse. ERR-1 pourrait donc jouer un rôle dans la régulation du renouvellement osseux, et donc dans les processus d'adhésion et de détachement cellulaire.

Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que ERR-1 est un récepteur proche de ER qui fixe les oestrogènes et interviennent dans la reconstruction osseuse. Or, nous avons montré que ER est, lui aussi, capable de se fixer sur le promoteur de l'ostéopontine et de l'activer (Jean-Marc Vanacker; résultats non publiés). Il sera intéressant d'étudier les effets de ERR-1 sur la régulation par ER de l'expression de l'ostéopontine. Peut-être retrouverons nous, le même type de régulation observé sur le promoteur de la lactoferrine, où ERR-1 a été montré potentialiser les effets de ER (Yang et al, 1996). Dans cette hypothèse, ER et ERR-1 interviendraient dans la formation de la matrice osseuse mais aussi indirectement dans la résorption.

### **3) ERR-1 et les stéroïdes.**

#### **3.1) ER, les oestrogènes et le tissu osseux.**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la formation ainsi que la résorption osseuse sont connues pour être sous le contrôle de certaines hormones et de cytokines. Ainsi les oestrogènes semblent jouer un rôle crucial dans le métabolisme osseux. L'invalidation de ER $\alpha$  chez la souris est capable d'entraîner une baisse de la densité osseuse de 20 à 25% ce qui suggère un effet direct de ER $\alpha$  dans la physiologie osseuse (revue dans Korach, 1994). De plus jusqu'à présent les oestrogènes sont considérés comme un des meilleurs moyens de prévention et de traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. Mais la faible concentration de ER dans les ostéoblastes et les ostéoclastes ne permet pas, réellement, de comprendre comment les oestrogènes arrivent à médier de tels effets, lors d'un traitement contre l'ostéoporose. L'existence d'autres récepteurs proches de ER comme le deuxième récepteur ER $\beta$  qui vient

d'être isolé ou encore ERR-1 pourrait être une solution (Kuiper et al, 1996; Bonnelye et al, 1997). ERR-1, comme nous venons de le voir, pourrait jouer un rôle *in vivo* dans le métabolisme osseux. Contrairement à ER, ERR-1 ne semble pas capable de fixer les oestrogènes mais certaines études récentes semblent cependant suggérer que ERR-1 puisse être régulé par un stéroïde.

### 3.2) ERR-1 et les stéroïdes.

#### 3.2.1 Recherche du ligand de ERR-1.

ERR-1 étant un récepteur proche de ER, nous avons testé différents dérivés des oestrogènes dans l'espoir de trouver le ligand de ERR-1. Nous avons donc testé le 17 $\beta$ -oestradiol, le raloxifène, un agoniste des oestrogènes, le DHEA (pour Déhydroépiandrostérone) et la pregnenolone qui sont des molécules de la voie de synthèse des oestrogènes. Tous ces composés se sont avérés inactifs sur l'activité transcriptionnelle de ERR-1. De plus ERR-1 semble pouvoir agir de manière constitutive dans un milieu contenant du sérum déplété en hormones et sans rouge de phénol (qui est connu pour pouvoir mimer les effets des oestrogènes). Au premier abord ERR-1 ne semble donc pas pouvoir fixer des oestrogènes ou des molécules proches. Fait intéressant, nous n'avons pas pu inhiber l'activité de ER dans des conditions de culture déplétées en hormones ce qui pourrait suggérer que, soit notre milieu n'est pas correctement déplété de molécules actives, soit que ERR-1 n'a pas de ligand.

#### 3.2.2 Le profil d'expression de ERR-1, un argument en faveur d'une régulation de ERR-1 par les stéroïdes.

Quand on pense à la régulation de ERR-1 par des stéroïdes, deux voies de recherches, différentes à tester, s'ouvrent à nous. La première concerne la régulation de l'expression de ERR-1 par des stéroïdes et la deuxième porte sur le rôle potentiel que peut avoir un stéroïde en tant que ligand de ERR-1. Au vue des avancées de notre travail sur la fonction de ERR-1 ces deux voies, qui ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusives, restent ouvertes.

Des résultats récents nous ont permis de voir que le profil d'expression de ERR-1 est cohérent avec un contrôle de son expression par des stéroïdes. En effet, nous avons

montré par hybridation *in situ* que l'expression de ERR-1 était régulée au cours des modifications de la glande mammaire que pouvait engendrer la gestation. Ainsi l'expression de ERR-1 est induite au cours de la gestation et son niveau d'expression est maintenue au cours de la lactation (données non publiées). En revanche, ERR-1 n'est pas exprimé dans les canaux ni dans les bourgeons terminaux de la glande mammaire à 40 jours. Il en est de même au cours de l'involution qui correspond à la résorption du tissu sécréteur après la lactation. La gestation et la lactation sont deux étapes qui sont régulées par les oestrogènes. Ainsi la croissance des canaux de la glande mammaire et la synthèse de protéines comme la lactoferrine et la prolactine, intervenant dans la fabrication du lait, sont stimulées par les oestrogènes (Yang et al, 1996; Shyamala, 1997). Rappelons que la lactoferrine est un gène cible de ERR-1 et que la prolactine pourrait en être un, un élément SFRE ayant été mise en évidence récemment dans son promoteur (Yang et al, 1996; Johnston et al, 1997).

De plus nous avons pu détecter l'expression de ERR-1 dans les testicules et les ovaires chez l'adulte. Plus précisément ERR-1 est très exprimé dans les cellules de Sertoli. Ces cellules ont la propriété d'absorber la testostérone produite dans les cellules de Leydig et de la convertir en oestradiol. La majorité des oestrogènes chez l'homme provient, d'ailleurs, de cette conversion. De plus ERR-1 est exprimé dans les cellules de la granulosa des ovocytes mûrs. Or ces cellules ont la propriété de fabriquer la progestérone et l'oestradiol sous l'influence de l'hormone lutéinisante LH.

Ainsi que ce soit dans la glande mammaire, les testicules ou les ovaires, l'expression de ERR-1 peut donc être corrélée avec une régulation par des stéroïdes. Il serait donc intéressant de tester, comme nous avons déjà commencé à le faire, différents stéroïdes afin de savoir si d'une part ces hormones peuvent fixer et activer ERR-1 et d'autre part si elles peuvent activer l'expression de ERR-1. Si le ligand de ERR-1 est un oestrogène ou un dérivé des oestrogènes, ceci nous permettrait de considérer ERR-1 comme un récepteur pouvant intervenir, au même titre que les récepteurs ER, dans le rétablissement de la masse osseuse *via* les oestrogènes en cas d'ostéoporose. La même remarque peut d'ailleurs être faite en cas de contrôle de l'expression de ERR-1 par les oestrogènes, bien que dans ce cas l'effet soit plus indirect.

#### **4) En conclusion**

Jusqu'à présent le ligand de ERR-1 n'a pas été identifié, mais le profil d'expression de ERR-1 qui comprend l'os, la glande mammaire, les testicules, ou encore les ovaires, à savoir des tissus cibles de stéroïdes peut suggérer qu'il appartient à la famille des stéroïdes. On peut aussi penser que l'expression de ERR-1 soit activée par des stéroïdes et comme discuté précédemment, il va être intéressant de tester ces deux hypothèses. De plus, préciser le profil d'expression de ERR-1 nous permettra d'identifier le type cellulaire et le niveau de différenciation des cellules où ERR-1 est exprimé. Grâce à ces données, nous pourrions alors identifier d'autres gènes cibles de ERR-1 intervenant dans le métabolisme osseux. En bref, si il paraît clair que ERR-1 intervient dans la physiologie osseuse, son rôle reste encore à préciser. Les nombreuses voies d'études que nous venons de discuter nous permettront, sans doute, d'y voir plus clair dans un futur proche *via* le travail que nous effectuerons en stage Post Doctoral.

## RESUME

### Article 3

#### **Expression of the Estrogen Related Receptor 1 (ERR-1) Orphan Receptor During Mouse Development.**

Plusieurs raisons nous ont incité à étudier l'expression de ERR-1. Tout d'abord, à l'époque, peu de chose étaient connues sur le profil d'expression de ERR-1. En effet, en dehors d'une expérience de « Northern Blot » réalisée par Vincent Giguère en 1988 qui montrait que ERR-1 pouvait s'exprimer dans le cerveau, le coeur et le rein de rat adulte, aucune autre expérience n'avait été réalisée depuis, pouvant nous informer davantage sur l'expression et sur la fonction de ce récepteur. De plus, lorsque nous avons décidé d'étudier, par hybridation *in situ*, l'expression de ERR-1 au cours de la formation du tissu osseux à E15,5 et E17,5, nous nous sommes rendus compte que cette expression n'était pas spécifique de l'os et qu'il existait d'autres régions où ERR-1 était exprimé. Enfin à cette époque, le profil d'expression de ERR-2, le récepteur nucléaire le plus proche de ERR-1 venait juste d'être décrit. Il montrait que ERR-2 était exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire de la souris et intervenait dans la formation du chorion et du placenta (Pettersson et al, 1996). Il était donc intéressant de savoir où ERR-1 pouvait être exprimé et si comme ERR-2, il pouvait intervenir au cours des toutes premières étapes du développement embryonnaire. Ceci est d'autant plus important que ces étapes sont cruciales et conditionnent, par la suite, le devenir de l'embryon. L'expression de ERR-1, au cours de ces processus, pourrait donc suggérer un rôle biologique primordial de ce gène dans ces étapes initiales du développement embryonnaire comme c'est le cas pour ERR-2.

Dans un premier temps, puisque ERR-2 est exprimé dans les cellules ES qui dérivent directement des blastomères du blastocyste non encore implanté dans la muqueuse utérine, nous avons décidé d'étudier s'il en était de même pour ERR-1. Pour cela, nous avons utilisé la technique de RT-PCR sur des ARNs extraits de cellules ES. En prenant des amorces spécifiques pour ERR-1 et ERR-2, nous avons montré que ces deux gènes étaient exprimés

dans ces cellules. Ceci suggérait donc que ERR-1 pouvait s'exprimer très précocement au cours du développement embryonnaire. Ceci nous a donc encouragé à étudier des étapes plus tardives par la technique d'hybridation *in situ*, entre les stades E8,5 et E17,5 afin de pouvoir couvrir une grande partie du développement embryonnaire de la souris.

Nous avons ainsi pu montrer que ERR-1 était exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire à E8,5 dans les cellules trophoblastiques et les cellules mésodermiques du sac vitellin. Dans les stades ultérieurs, le profil d'expression s'agrandit et suggère que ERR-1 peut intervenir dans différents systèmes biologiques. En effet, ERR-1 s'est avéré être exprimé dans la plus grande partie du système nerveux central (SNC) et dans la moelle épinière à E13,5. En revanche, cette expression qui persiste dans la moelle épinière au niveau de la zone intermédiaire à E15,5 et E17,5, est transitoire dans le SNC. En effet à E15,5, ERR-1 n'est presque plus détectable dans le SNC. De plus l'expression de ERR-1 a été observée dans l'épiderme et plus particulièrement dans les cellules de Malpighi. Enfin il est aussi exprimé dans le coeur ainsi que dans les muscles.

L'augmentation du taux d'expression de ERR-1 au cours de la formation des myotubes, nous a d'ailleurs poussé à penser que ERR-1 pouvait intervenir dans la différenciation musculaire. C'est pour cela que nous avons décidé de détailler l'étude de l'expression de ERR-1 au cours de la différenciation musculaire. Pour cela, en collaboration avec l'équipe d'Anne Bonnieu à l'INRA de Montpellier, nous avons recherché par la technique de « Northern Blot » l'expression de ERR-1 dans des ARNs extraits des cellules myoblastiques C2, non différenciées et différenciées en myotubes. C'est ainsi que nous avons montré que ERR-1 est davantage exprimé dans les myotubes que dans les myoblastes. Ceci corrèle, donc, bien avec ce que nous avons déjà observé par hybridation *in situ*. En bref, notre étude concernant l'expression de ERR-1 au cours du développement embryonnaire, nous a permis de montrer que ERR-1 pourrait être impliqué dans la différenciation de plusieurs types cellulaires dans le système nerveux, l'épiderme et le muscle.

Fait intéressant, dans tous ces systèmes, l'expression de ERR-1 est observée dans des cellules post-mitotiques: zone intermédiaire dans la moelle épinière, cellules de Malpighi dans l'épiderme, et myotube dans le muscle. En effet, toutes ces cellules ont un point

commun à savoir qu'elles viennent toutes de sortir du cycle cellulaire et commencent à se différencier. ERR-1 pourrait donc jouer un rôle dans la différenciation cellulaire.



## Expression of the estrogen-related receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development

Edith Bonnelye<sup>a</sup>, Jean Marc Vanacker<sup>a</sup>, Nathalie Spruyt<sup>a</sup>, Séverine Alric<sup>d</sup>, Brigitte Fournier<sup>b</sup>, Xavier Desbiens<sup>c</sup>, Vincent Laudet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Endocrin'os group, CNRS UMR 319, Mécanismes du développement et de la cancérisation, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, BP 447, 59019 Lille Cedex, France

<sup>b</sup>Novartis Pharma AG, K125 9-17, Basel, Switzerland

<sup>c</sup>Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, Bâtiment SN3, USTL, Villeneuve d'Ascq, France

<sup>d</sup>Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Croissance, INRA, Place Pierre Viala, 34060, Montpellier Cedex 1, France

Received 19 October 1996; revised version received 20 March 1997; accepted 18 April 1997

### Abstract

We studied the expression of the estrogen-related receptor 1 (ERR-1) during mouse embryonic development. ERR-1 is expressed at very early stages in ES cells and at E8.5 in the mesodermal cells of the visceral yolk sac. ERR-1 continues to be expressed later in mesodermal tissues and particularly in heart and in skeletal muscles. This expression persists during all the embryonic development and in adult stage. ERR-1 transcripts level increases during muscle differentiation. Accordingly, we show that ERR-1 expression increases during the myoblast to myotube transition in differentiating C2 myoblastic cells. ERR-1 has also been detected in the nervous system during embryonic development. At E10.5, a high level of ERR-1 transcripts can be observed in differentiated cells of the intermediate zone of the spinal cord which also suggests a role of ERR-1 in the differentiation of the nervous system. The same is observed in the telencephalon vesicles at E13.5. Later, at E15.5 and E17.5, expression persists in the spinal cord but decreases dramatically in the central nervous system. Moreover, ERR-1 expression increases during skin formation and is detected in the stratum spinosum which contains differentiated Malpighian cells. Finally, we also observed ERR-1 in endodermal derivatives such as the epithelium of intestine and urogenital system. The DNA target of ERR-1 has been identified to be the SF-1/FTZ-F1 responsive element (SFRE) and we show in this paper that SF-1/FTZ-F1 and ERR-1 bind to and activate transcription independently through the SFRE element. Our study suggests that ERR-1 may be implicated in numerous physiological or developmental functions, particularly in the muscle, the central and peripheral nervous system and the epidermis. Interestingly, in these various systems ERR-1 expression is correlated with post-mitotic cells stage, suggesting that ERR-1 may play a role in the differentiation process. © 1997 Elsevier Science Ireland Ltd.

**Keywords:** Estrogen receptor; ERR-1; Orphan receptors; Nuclear hormone receptors; Differentiation; Muscle; Central nervous system

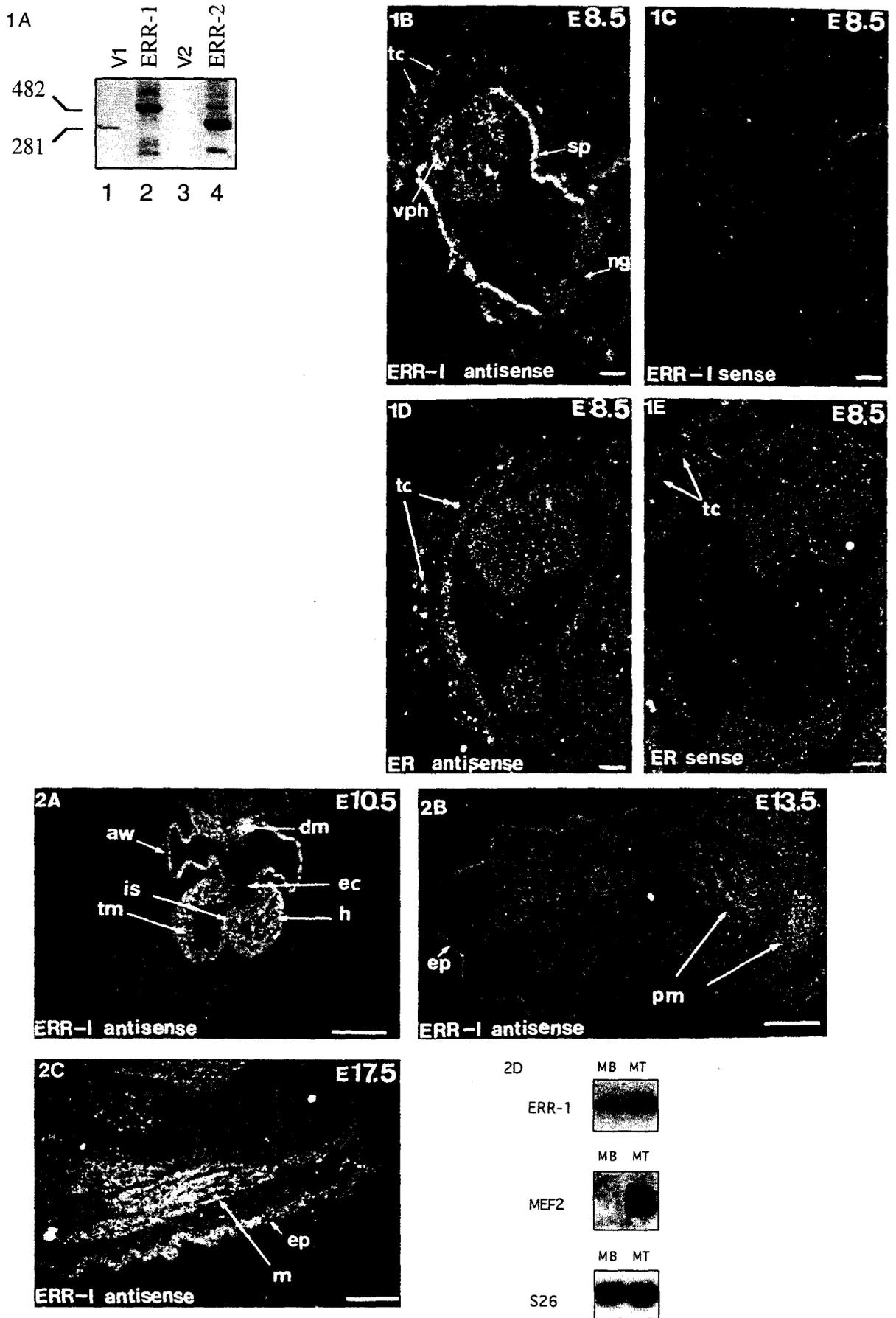
### 1. Introduction

The nuclear hormone receptor superfamily comprises ligand-regulated transcription factors that control the expression of target genes in response to extracellular signals (Beato et al., 1995; Gronemeyer and Laudet, 1995; Mangelsdorf et al., 1995). The superfamily includes receptors for steroid hormones, retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D as well as many members, referred to as

orphan receptors, for which no ligand has yet been identified. The various orphan nuclear receptors are likely to play important functional roles. For example, ROR $\alpha$  is critical for the development and differentiation of Purkinje cells (Hamilton et al., 1996) and SF1 is required for the development of sexual organs (Parker and Schimmer, 1996).

Nuclear receptors have a modular design that is conserved through evolution (Laudet et al., 1992). The DNA binding domain harbors the highest homology among the members of the superfamily. A second conserved domain, located at the carboxy terminus, is referred to as the ligand

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 20871094; fax: +33 3 20871111; e-mail: vlaudet@infobiogen.fr



binding domain. Based on sequence analysis of these conserved domains, the superfamily can be divided into six subfamilies among which orphan receptors are dispersed (Gronemeyer and Laudet, 1995; Laudet et al., submitted). Among these five subfamilies, the steroid receptor subfamily is particularly important since it includes the estrogen receptors (ER) as well as glucocorticoids, androgen, mineralocorticoids and progesterone receptors. In this subfamily, two orphan receptors (estrogen-related receptors 1 and 2; ERR-1 and ERR-2) have been identified by low stringency screening of human testis, kidney and cardiac cDNA libraries using the DNA binding domain of the human estrogen receptor as a probe (Green et al., 1986; Giguère et al., 1988).

Sequence alignment of human ERR-1, ERR-2 and ER revealed their close similarity in the DNA binding domain since ERR-1 exhibits 91% amino acid identity with ERR-2 and 68% with ER. The putative ligand binding domain of ERR-1 shows 63% identity when compared to ERR-2 and 36% to ER. Little is known about the functions of ERR-1 and ERR-2. The DNA target of ERR-1 has been identified to be the SF-1/FTZ-F1 responsive element (SFRE) that we found to mediate an activating transcriptional effect of ERR-1 (Bonnelye et al., in press). However, ERR-1 could act as a transcriptional repressor in some situations since it has been shown to inhibit the SV40 major late promoter during the early-to-late switch of expression (Wiley et al., 1993). Northern blot experiments have documented the expression of ERR-1 essentially in cerebellum, hippocampus and, to a lesser extent, in kidney, gut and heart tissues. In contrast, ERR-2 expression is observed at an early embryonic stage during a short window of time and at low amount in the adult heart and kidney (Giguère et al., 1988; Pettersson et al., 1996). Up to now, little is known concerning ERR-1 expression during embryonic development except that it is expressed during bone formation (Bonnelye et al., in press).

In situ hybridization experiments were performed to study the expression of ERR-1 during different stages of the mouse embryonic development. ERR-1 mRNA is

present early in the ontogeny since it can be detected in ES cells. In contrast to ERR-2, this expression does not decrease rapidly during development. The observed expression pattern suggests that ERR-1 may be implicated in the differentiation of several tissues like muscle, nervous system and skin. We also show that ERR-1 mRNA is present in some endodermal derivatives such as the epithelium of the oesophagus and of the intestine and in the urogenital system. Since the expression pattern of ERR-1 partially overlaps that of SF-1/FTZ-F1, both factors binding to the same DNA target, we finally questioned the interference between these two products and found them to act independently on the SFRE site.

## 2. Results

### 2.1. ERR-1 mRNA in mouse ES cells

As ERR-2 has been detected in mouse embryonic stem (ES) cells by Pettersson et al., 1996, we decided to study the ERR-1 expression in these cells by RT-PCR. Mouse ES cells are directly derived from the inner cell mass (ICM) of mouse blastocyst (Kuhn et al., 1991). Total RNAs from undifferentiated ES were extracted and retrotranscribed to single-stranded cDNA and processed by PCR using primers designed to amplify separately ERR-1 (481 bp) and ERR-2 (281 bp). As expected from the results of Pettersson et al. (1996), ERR-2 is expressed in ES cells (Fig. 1A, lane 4). ERR-1 corresponding signal was also detected in these cells (Fig. 1A, Lane 2) indicating early expression of this gene. As negative controls, reactions devoid of RNAs did not yield any fragment (Fig. 1A, lanes 1 and 3). This prompted us to study the expression pattern of ERR-1 during later embryogenesis and particularly in relation to organogenesis.

### 2.2. ERR-1 in muscles and in other mesodermal derivatives

Using a mouse antisense ERR-1 probe, we detected ERR-1 transcripts at an early stage of mouse development. At

Fig. 1. (A) RT-PCR analysis of ERR-1 and ERR-2 expression in ES cells. RNAs from ES cells were reverse transcribed and amplified with primers specific for ERR-1 or ERR-2, as stated. Reaction products were run on a 2% agarose gel. Values on the left side indicate the expected size of the amplification products of ERR-1 (482 bp) and ERR-2 (281 bp). Lanes V1 and V2 correspond to empty RT-PCR controls. (B) Section of an embryo at E8.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing a strong labelling in mesodermal cells of the visceral yolk sac (sp), in the ventricular region of the primitive heart (vph), and in trophoblastic cells (tc). (C) Adjacent sections hybridized with ERR-1 sense probe. (D) Section of an embryo at E8.5 hybridized with ER antisense probe showing the labelling of trophoblastic cells (tc). (E) Adjacent sections hybridized with ER sense probe. ng, neural groove; sp, splanchnic mesoderm; tc, trophoblastic cells; vph, ventricular region of the primitive heart. Bar = 20  $\mu$ m.

Fig. 2. Expression pattern of ERR-1 in embryonic heart and muscles at E10.5–E17.5. (A) Heart section at E10.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing a strong labelling in the atrial and trabecular myocard walls (aw and tm), the dorsal mesocardium (dm) and the interventricular septum (is). Bar = 150  $\mu$ m. (B) Limb bud section at E13.5 hybridized with ERR-1 antisense probe showing ERR-1 expression in the premyocardial mass (pm) and in the epidermis (ep). Bar = 250  $\mu$ m. (C) Limb section at E17.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing increased ERR-1 expression in muscles (m) and in epidermis (ep). Bar = 250  $\mu$ m. (D) Northern blot analysis of ERR-1 expression in C2 myogenic cells. Upper part: comparison of ERR-1 mRNA levels in undifferentiated myoblast cells (MB) and differentiated myotubes (MT) of C2 cells. ERR-1 is much more expressed in myotube (MT). Middle part: same blot hybridized with MEF2 used as a differentiation control probe. Lower part: same membrane hybridized with the S26 probe, a mRNA homogeneity control probe. aw, atrial wall; dm, dorsal mesocardium; ec, endocardial cushion; ep, epidermis; h, heart; is, interventricular septum; m, muscle; pm, premyocardial mass; tm, trabecular myocard wall.

E8.5, a strong ERR-1 expression can be observed in the mesodermal cells of the visceral yolk sac (see sp in Fig. 1B) and in the ventricular region of the primitive heart (see vph in Fig. 1B). At this stage, the heart is an asymmetrical globular structure which is divided into a ventricular and an atrial chamber, both derived from splanchnic intraembryonic mesoderm. The expression of ERR-1 parallels the one observed, later on, in the myocardial cells of the primitive heart tube (Fig. 2A). This labelling is specific since no signal was detected with ERR-1 sense probe (Fig. 1C). Interestingly, at E8.5, the extraembryonic trophoblastic cells which form the structural basis for the nutrient-waste exchange between the maternal and the embryonic blood circulatory system (Amoroso, 1958) co-express ERR-1 and ER (see tc in Fig. 1B and Fig. 1D, respectively). These results suggest that ERR-1 may play an important role during the preimplantation and the implantation processes.

Among mesodermal tissues, ERR-1 is expressed in kidney (data not shown) and essentially in muscles and heart. At E10.5, important morphological changes take place in the heart and in the vessels that emerge from or drain into it. ERR-1 continues to be expressed in the heart at this stage (see h in Fig. 2A and 3A), particularly in the atrial wall (see aw in Fig. 2A) and in trabeculations of the common ventricular chamber (see tm in Fig. 2A). ERR-1 transcripts can also be observed in the dorsal mesocardium (see dm in Fig. 2A). However, the endocardial cushion associated with the wall of the atrio-ventricular canal is not labelled (see ec in Fig. 2A). The muscular part of the interventricular septum (see is in Fig. 2A), which is mainly composed of non-trabeculated muscle, is also positive for ERR-1 expression. At E13.5, ERR-1 labelling displays the same basic characteristics as those observed at E10.5 (data not shown). Later on, at E15.5 and E17.5, when the heart has adopted its definitive prenatal configuration, ERR-1 is expressed in the atrial wall and the trabecules as well as in the wall of the myocardial ventricles (data not shown). Moreover, the expression in heart persists in the adult tissues as revealed by Northern blot (see H in Fig. 8B). In conclusion, ERR-1 is expressed during all the embryonic heart formation, particularly in the myocard and the pericard and later on in the adult heart. This suggests that ERR-1 may be involved in heart/muscles differentiation and in the maintenance of its adult function.

The expression observed in heart is to be paralleled to the pattern displayed in skeletal muscles. ERR-1 was detected at E13.5 in the premuscular mass of the limb bud (see pm in Fig. 2B). At this time myogenic cells elongation takes place, prior to fusion into myotubes. ERR-1 level increases at E15.5 and becomes very important at E17.5 within the muscles of the forelimb (see m in Fig. 2C). At E17.5, the muscle fibers are visible indicating a differentiated state of myogenic cells. ERR-1 is also expressed in other muscles such as masseter muscles and thoracic muscles but not in smooth muscles. Moreover, as for the heart, the expression of ERR-1 in muscle persists in the adult (see Mu in Fig. 8B). These results suggest that ERR-1 expression increases during mus-

cle development and it is tempting to hypothesize that ERR-1 plays a part in the differentiation of the muscle. In order to obtain information on ERR-1 implication in this process, we studied the expression of ERR-1 in undifferentiated or differentiated myogenic cells. Myoblasts can be induced to fuse and to develop into myotubes when cultured in low serum conditions. This can be monitored by the induction of MEF2 expression in myotubes but not in myoblasts as seen by Northern blot (Fig. 2D, middle part) (Cserjesi and Olson, 1991). This experiment also indicates that ERR-1 mRNA is expressed in myoblasts (MB). In comparison, the amount of this messenger is higher in the differentiated myotubes (MT) (Fig. 2D, upper part). S26 probe was used as a loading control (Fig. 2D, lower part). Thus, in this system ERR-1 expression correlates with the differentiated state of the cells. The same phenomenon may also occur in cardiac muscles as ERR-1 continue to be expressed in adult tissues (see H in Fig. 8B).

### 2.3. ERR-1 during neural differentiation

The expression of ERR-1 during nervous system development is particularly complex (Table 1). Indeed, we detected ERR-1 early and at a low level within the neural groove cells at E8.5 (see ng in Fig. 1B). At E10.5, when the neural tube is closed, ERR-1 mRNAs are present at a high level in the cephalic neuroepithelium (see ne in Fig. 3A). Expression is also detected more caudally in the embryonic spinal cord (see sc in Fig. 3A). Interestingly, all along the anteroposterior axis, ERR-1 is expressed according to a dorso-ventral gradient in the neural tube. In the developing vertebrate spinal cord, neurons are generated in a specific sequence both with respect to time and position along the dorso-ventral axis (Nornes and Carry, 1978). The spinal cord at embryonic day E10.5 may be functionally divided into two major regions: the ventricular zone (VZ) and the intermediate zone (IZ) (for nomenclature, see Boulder Committee 1970). The ventricular zone consists of actively dividing precursors of differentiated neurons and glia (Nornes and Carry, 1978). As they differentiate, these precursors exit from the cell cycle, and migrate away from the ventricular zone into the intermediate zone. The first neural progenitors differentiate in the ventral part of the neural tube and give rise to the presumptive motoneurons. ERR-1 transcripts are detected in differentiating cells of the intermediate zone in the ventral and peripheral parts of the neural tube and weakly in the ventricular zone (see VZ and IZ in Fig. 3B). Later in development, from E11.5 to E14.5, the ventricular zone becomes attenuated and eventually disappears as cells differentiate and the intermediate zone becomes prominent (Nornes and Carry, 1978). Thus, at E15.5 and E17.5 all the spinal cord is labelled by the ERR-1 probe (data not shown, and Fig. 3K). However, ERR-1 is not detected in axons which emerge from the spinal cord (see ax in Fig. 3K).

In the central nervous system, ERR-1 expression is

Table 1  
Relative levels of ERR-1 mRNA in the nervous system

	E13.5	E15.5	E17.5	ER (E13.5)
<i>Telencephalon</i>				
Corpus striatum lateral	+++	ND	ND	-
Corpus striatum median	+++	ND	ND	-
Caudate/putamen	++	ND	ND	-
Roof of the neopallial cortex (future cerebral cortex)	+++	++	-	-
Choroid plexus	++	+	-	-
Falx cerebri	++	-	-	-
Wall of the telencephalon	+++	+	+	-
<i>Diencephalon</i>				
Thalamus	+++	-	-	++
Hypothalamus	+++	-	-	++
<i>Midbrain</i>				
Rhombic lip	+++	-	-	-
Tegmentum of pons	+++	+	+	-
Region of inferior cerebellar peduncle				
<i>Myelencephalon</i>				
Alar plate (medulla oblongata)	+++	ND	ND	-
Mantle layer of medulla oblongata	+++	+	ND	-
Medullary raphe	++	+	ND	-
<i>Auditory system</i>				
Semicircular canal	+++	-	-	-
Crus commune of the labyrinth	+++	-	-	-
External auditory meatus	+++	-	-	-
<i>Spinal cord</i>				
Alar lamina	+++	++	++	-
Fundamental layer (motor neurons)	+++	++	++	+
<i>Nervous ganglia</i>				
Trigeminal (V)	+++	++	+	-
Vestibular (VIII)	+++	++	-	-
Cochlear (VIII)	+++	++	-	-
Spinal accessory (XI)	++	ND	-	-
Superior cervical sympathetic	+++	ND	-	-
Vagus nerve (X)	+++	+	+	-
Glossopharyngeal (IX)	+++	++	ND	-
<i>Olfactory system</i>				
Olfactory epithelium	+++	++	-	-

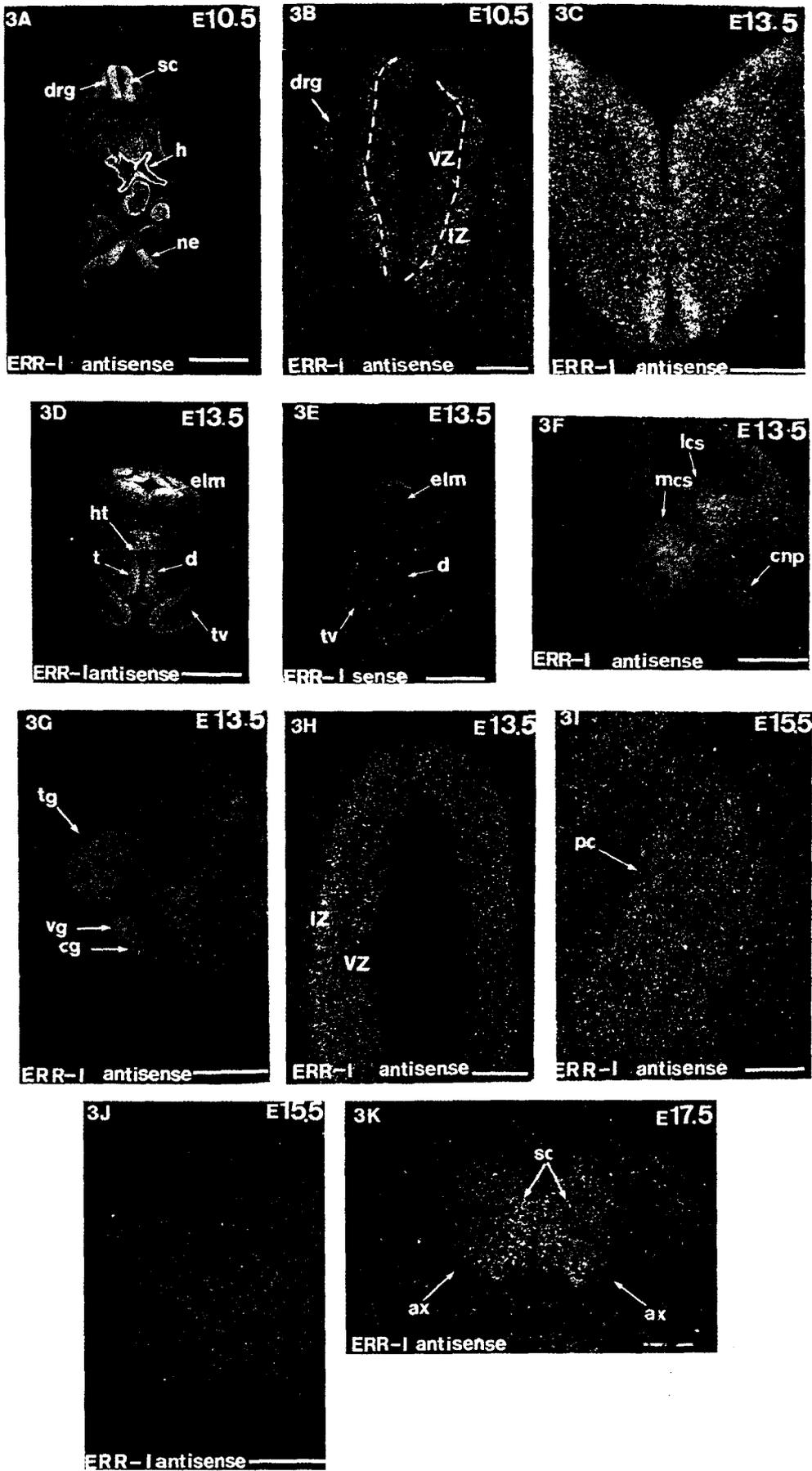
+, weak; ++, moderate; +++, strong; ND, not determined.

detected in the cerebral cortex at E13.5 (Fig. 3C) as well as in all nervous vesicles like diencephalon and telencephalon (see d and tv in Fig. 3D). As for the spinal cord, neuroepithelium is the constituent of the telencephalon. The differentiation process described for the spinal cord is consistent with that described in the brain stem mouse (Pierce, 1973). Indeed, ERR-1 in the telencephalon is much more expressed in the intermediate zone which is less developed compared to the one of the spinal cord at E13.5 (see IZ in Fig. 3H).

In the diencephalon, the thalamus and the hypothalamus are labelled by ERR-1 probe (see t and ht in Fig. 3D, respectively). ERR-1 mRNA can also be observed in the mesencephalon but the labelling is rather periventricular (data not shown). As seen in Fig. 3D, ERR-1 is much more expressed in the ependymal layer which corresponds to the intermediate zone of the midbrain (elm) than in the mantle (Fig. 3D). ERR-1 transcripts are also present in the junction region between midbrain and rostral and in the anterior lobe of the pituitary (data not shown). All these labellings are spe-

cific since no signal can be detected with the control sense probe (Fig. 3E).

Moreover, at the basal level of the telencephalon at E13.5, we can observe the ganglionic cumulus which is a matrix zone from which central brain ganglia arise. The ganglionic cumulus can be divided into a median and a lateral corpus striatum (see mcs and lcs, respectively, in Fig. 3F), which both express ERR-1. From the lateral corpus striatum, the caudate nucleus and the putamen are formed. Interestingly, these two structures, which will form the basal ganglia, are also labelled by the ERR-1 probe (see cnp in Fig. 3F). Thus, ERR-1 is observed in the components of the future extrapyramidal system (Fig. 3L; structures in which ERR-1 expression is detected are underlined) which controls the involuntary movements. From the median corpus striatum, the matrix zone of the paleocortex arises. Noteworthy, ERR-1 expression is also observed in the neopallial cortex (data not shown). Moreover, ERR-1 is also expressed in the cerebellar peduncle, in the basal region of the pons



and in the medullary raphe (data not shown). The latter regions correspond to the location of decussation of the medial lemniscus. All these last regions constitute, with the spinal cord where ERR-1 is also expressed, the path of the pyramidal system which controls the voluntary movements (Fig. 3L). These observations suggest that ERR-1 is expressed in most if not all centers that are parts of the pyramidal and extrapyramidal systems.

Interestingly, at E15.5, the overall expression level of ERR-1 decreases with respect to E13.5 (compare Fig. 3C and Fig. 3J). Nevertheless, ERR-1 labelling persists in some

regions as in the olfactory epithelium (see oe in Fig. 4A), in the anterior pituitary (on the site of active cellular and vascular proliferation; data not shown), and in the neopallial cortex (future cerebral cortex; data not shown). ERR-1 expression is always detected in the periventricular region of the cerebral trunk but its level decreases dramatically at this stage (Fig. 3J). As mentioned above ERR-1 is still expressed in the spinal cord (data not shown). Finally, ERR-1 is expressed in the rostral extension of the primitive cerebellum (see pc in Fig. 3I), as well as the choroid plexus (data not shown). Finally, at E17.5, ERR-1 expression can

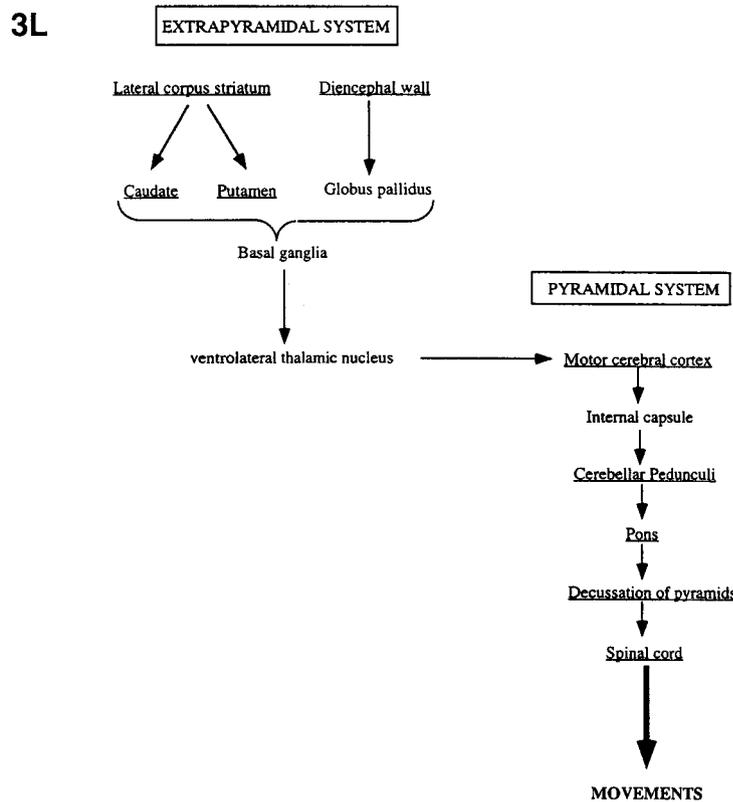
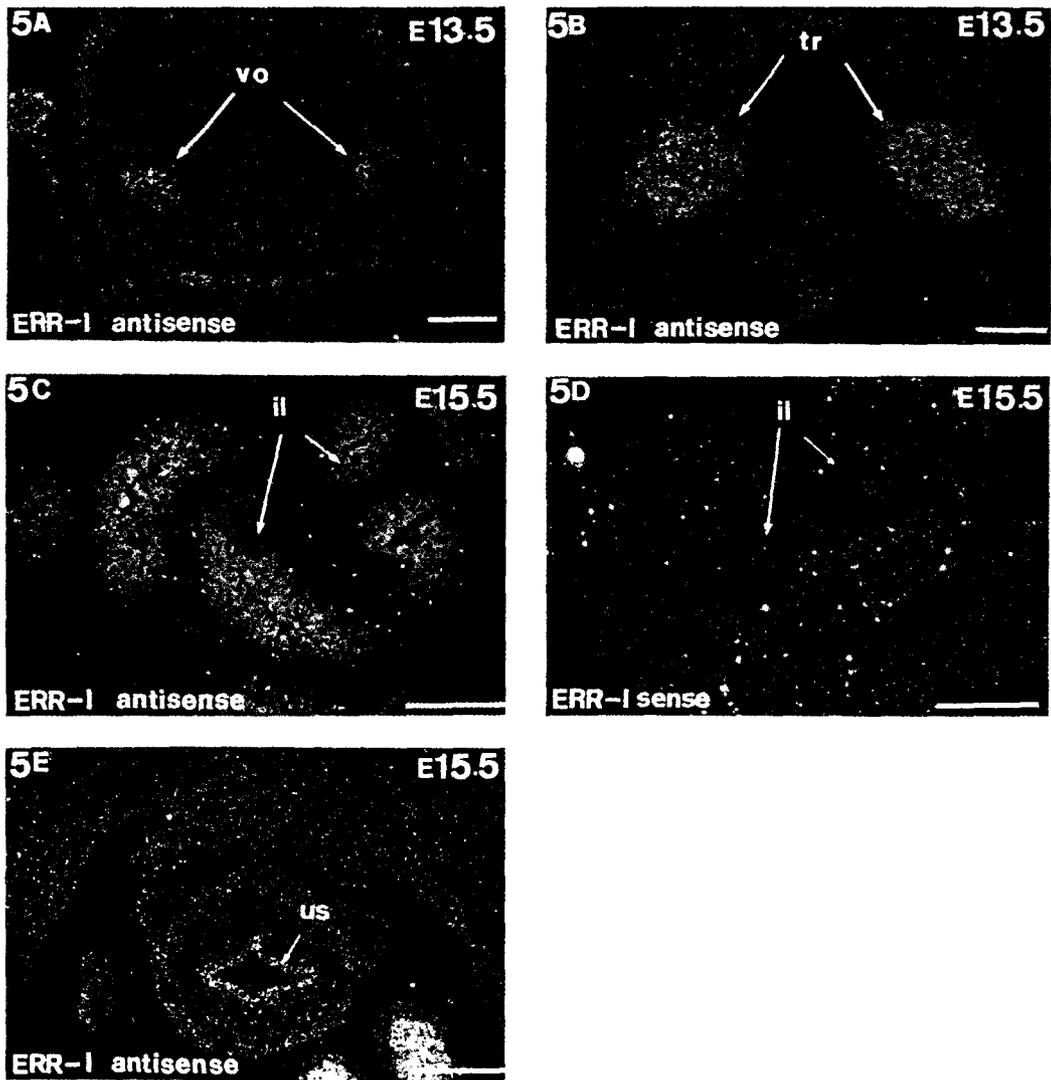
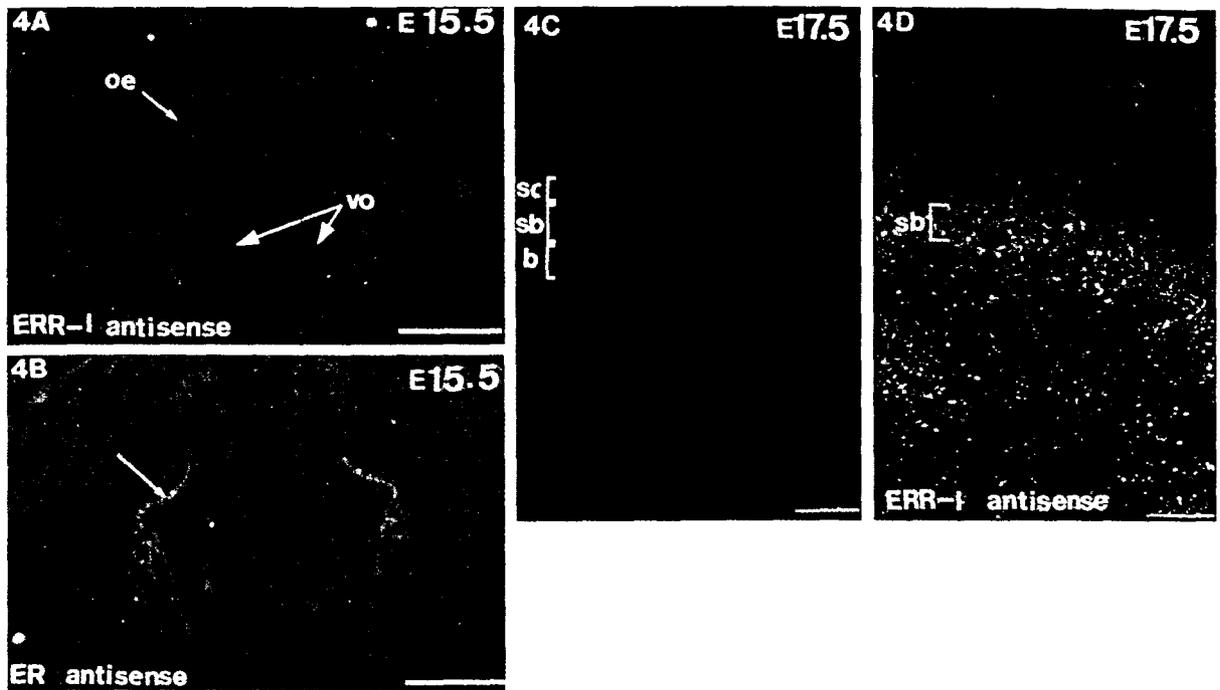


Fig. 3. ERR-1 is strongly expressed in the central nervous system at E13.5, especially in the intermediate zone of the cephalic zone and in the spinal cord. (A) Transversal section of the mouse embryo at E10.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing ERR-1 expression in the heart (h) and in the nervous system. Bar = 150  $\mu$ m. (B) Magnification of the transversal section of the neural tube at E10.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing ERR-1 expression in the differentiating cells of the intermediate zone (IZ) and not in the proliferating cells of the ventricular zone (VZ). Bar = 150  $\mu$ m. (C) Hybridization with the ERR-1 antisense probe of a transversal section of the brain at E13.5, showing ERR-1 expression in all the cerebral cortex. Bar = 550  $\mu$ m. (D) A more caudally transversal section of the mouse brain embryo at E13.5, hybridized with the ERR-1 antisense probe. ERR-1 is expressed in the intermediate zone of the telencephalon vesicles (tv), as well as in the diencephalon (d). Bar = 800  $\mu$ m. (E) Adjacent sections hybridized with the ERR-1 sense probe. Bar = 800  $\mu$ m. (F) A more caudally transversal section of the telencephalon mouse brain at E13.5 hybridized with ERR-1 antisense probe. A strong labelling in the ganglionic cumulus and more specifically in the lateral corpus striatum (lcs) and the median corpus striatum (mcs) is clearly visible. The caudate nucleus and the putamen (cnp) which form from the lateral corpus striatum are also stained. Bar = 550  $\mu$ m. (G) Transversal section of the mouse mesencephalon at E13.5 hybridized with ERR-1 antisense probe: strong labelling in the trigeminal (tg), vestibular (vg) and cochlear ganglia (cg). Bar = 550  $\mu$ m. (H): Magnification of a transversal section of mouse telencephalon at E13.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe. ERR-1 is expressed in the differentiating cells of the intermediate zone (IZ) and not in the proliferating cells of the ventricular zone (VZ). Bar = 150  $\mu$ m. (I) Transversal section of the primitive cerebellum (pc) at E15.5 hybridized with the ERR-1 antisense. Bar = 250  $\mu$ m. (J) Transversal section of the cerebral cortex at E15.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe. We can observe that the ERR-1 expression decrease at this old embryonic stage. Compare the expression level between E13.5 (C) and E15.5 (J). Bar = 550  $\mu$ m. (K): Transversal section of mouse spinal cord (sc) at E17.5. ERR-1 expression level increases in the spinal cord (sc) but ERR-1 is not expressed in the axons which emerge from the spinal cord. Bar = 550  $\mu$ m. (L) Diagrammatic representation of the extrapyramidal system and pyramidal system. The structures in which ERR-1 expression was detected are underlined. ax, axons; cg, cochlear (VIII) ganglion; cnp, caudate nucleus-putamen; d, diencephalon; drg, dorsal root ganglion; elm, ependymal layer of midbrain; h, heart; ht, hypothalamus; IZ, intermediate zone; lcs, lateral corpus striatum; mcs, median corpus striatum; ne, neural epithelium; pc, primitive cerebellum; sc, spinal cord; t, thalamus; tg, trigeminal (V); tv, telencephalon vesicles; vg, vestibular (VIII) ganglion; VZ, ventricular zone.



be observed in the cerebellar peduncle, the pons and the spinal cord (Fig. 3K) and persists in adult tissues (see Br in Fig. 8B).

Concerning the ganglia, several of them expressed ERR-1. At E10.5, from the midtrunk region caudally to the mid-tail region, the dorsal root ganglia become particularly prominent structures. ERR-1 expression is detected in these ganglia (see drg in Fig. 3A,B). At E13.5, in the metencephalon, the cranial part of the rhombencephalon, the trigeminal (V) ganglion, the vestibular (VIII) and the cochlear (VIII) ganglia are labelled by ERR-1 probe (see tg, vg and cg in Fig. 3G). At E15.5 ERR-1 transcript is still detected in the trigeminal (V) and the cochlear (VIII) ganglia, and moreover in the glossopharyngeal (IX) and in the spinal accessory (XI) ganglia (data not shown). Finally, the vagal (X) ganglia, which is located in the myelencephalon, is also labelled by the ERR-1 probe at E17.5 (data not shown).

We also studied the expression of the estrogen receptor (ER) in the central nervous system (CNS). As expected, we detected ER expression in the anterior pituitary, but to a much higher level than that of ERR-1. The same situation is also true for the thalamus and hypothalamus at E15.5 (data not shown). As exemplified in Fig. 4B, the olfactory region represents a particularly interesting case, since both receptors are expressed in this structure (ER again to a higher level than ERR-1), but at different sites (above the epithelium for ER and in the epithelium for ERR-1; compare Fig. 4A and Fig. 4B). In the other regions of the CNS, ER is always less expressed than ERR-1. In the embryonic spinal cord, ER is expressed at the level of the motoneurons (data not shown).

#### 2.4. Expression of ERR-1 during skin formation

As differentiation of the skin progresses, the epidermis becomes stratified, such that defined layers of proliferating and differentiating cells become apparent (Montagna and Parakkal, 1974). At E17.5 the epidermis consists of approximately five cell layers (Fig. 4C). Together, the basal cell layer (b) and the first suprabasal cell layer comprise the proliferating cell compartment, which at this stage is referred to as the Malpighian layer. Cells of the Malpighian layer stop their growth, differentiate and migrate into the

second and third suprabasal cell layers (see sb in Fig. 4C) and finally to the outermost layer, the stratum corneum (see sc in Fig. 4C). ERR-1 transcripts are detected in the epidermis at E13.5 and their amount increases to E17.5 (see ep in Fig. 2B and Fig. 2C, respectively). More precisely at E17.5, ERR-1 is expressed in the cells immediately above the basal cell layer. These cells are differentiating cells of the suprabasal layer and not the proliferating cell of the Malpighian layer (see sb in Fig. 4D).

#### 2.5. ERR-1 in the endodermal derivatives

At E13.5, ERR-1 expression is observed in the pharyngeal wall of the vomeronasal organ (Jacobson's organ) (see vo in Fig. 5A). At this stage, ERR-1 is also expressed in the entrance of the esophagus and in the mucosal lining of the stomach (data not shown). We also observed, at a low level, ERR-1 transcripts in the liver and in the lungs (data not shown). The lobes of the thymic rudiment (see tr in Fig. 5B) are also labelled. Finally, the definitive and vesical region of the urogenital system is labelled by ERR-1 probe (data not shown). Interestingly, the gonads are not labelled by ERR-1 probe, in striking contrast with ER, which is, as expected, expressed around the Wolffian duct as well as in the gonad primordium (data not shown).

At E15.5, ERR-1 expression persists in the vomeronasal organ (see vo in Fig. 4A). Relative to the previous stage studied, the thymic rudiment and the lung are less labelled (data not shown). ERR-1 is expressed in all the derivatives of the primitive gut (data not shown): the oral cavity, the laryngeal aditus, the epithelium of the esophagus (where the expression level is low), the anal canal, and the epithelium of the intestine. Only the case of the latter is exemplified in Fig. 5C (il; compare with the control sense probe in Fig. 5D). As at E13.5, ERR-1 is expressed in the internal epithelium of the urogenital sinus (see us in Fig. 5E). ERR-1 expression is also detected in the thyroid gland (data not shown). This pattern is also observed at E17.5 (data not shown).

#### 2.6. ERR-1 and ER in mammary gland morphogenesis

Mammary gland morphogenesis results from an interac-

Fig. 4. Expression of ERR-1 in the olfactory region at E15.5. (A) Transversal section of the olfactory system at E15.5 hybridized with ERR-1 antisense probe showing that ERR-1 is expressed in the olfactory epithelium (oe) and in vomero-nasal organs (vo). Bar = 550  $\mu$ m. (B) Adjacent section is hybridized with the ER antisense probe. The arrow points out the expression of ER above the olfactory epithelium. Bar = 550  $\mu$ m. (C,D) Expression of ERR-1 in the developing skin. (C) Hoesch coloration of a paraffin section of embryo at E17.5 showing the individual layers of the epidermis at this stage of development. Bar = 50  $\mu$ m. (D) Same section hybridized with ERR-1 antisense probe showing ERR-1 expression in the differentiating cells of the suprabasal layer. Bar = 50  $\mu$ m. b, basal layer; oe, olfactory epithelium; sc, stratum corneum; sb, suprabasal cell layer; vo, vomero-nasal organ.

Fig. 5. ERR-1 expression in mouse endodermal derivatives. (A) Transversal section of the olfactory system of mouse at E13.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing the expression in the vomero-nasal organs (Jacobson organs) (vo). Bar = 250  $\mu$ m. (B) Transversal section of the thymic rudiment (tr) at E13.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing an important expression of ERR-1 in this organ. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Transversal section of the intestine at E15.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing a strong labelling in the epithelium of the intestinal loges (il). Bar = 550  $\mu$ m. (D) Adjacent intestine (il) section at E15.5 is hybridized with the ERR-1 sense probe. Bar = 550  $\mu$ m. (E) Transversal section of the uro-genital system at E15.5 hybridized with the ERR-1 antisense probe showing a restricted ERR-1 expression in the luminal epithelium of the sinus (us). Bar = 550  $\mu$ m. il, intestinal loges; tr, thymic rudiment; us, urogenital sinus; vo, vomero-nasal organs.

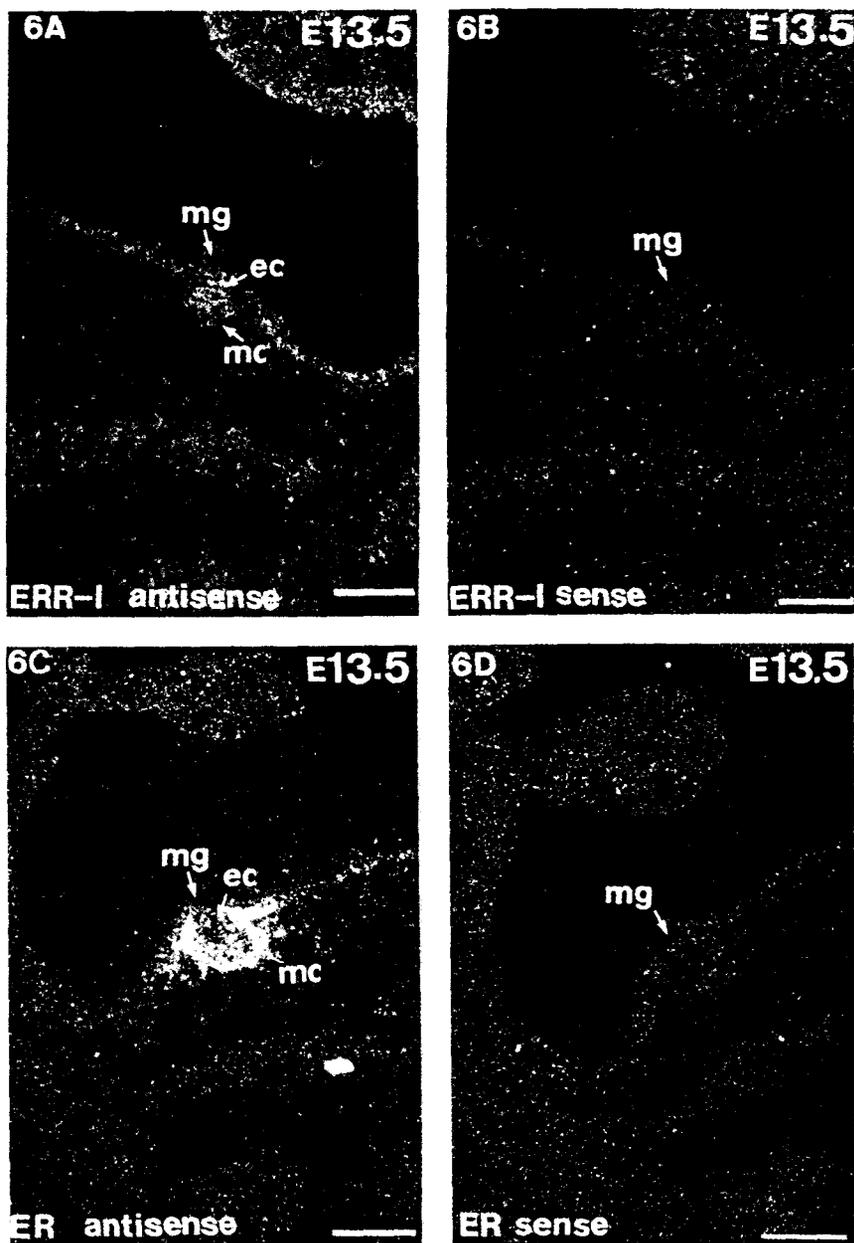


Fig. 6. ERR-1 expression in the primary mammary bud. (A) Transversal section of mammary gland(mg) primordium at E13.5 hybridized with ERR-1 antisense probe showing that ERR-1 is expressed in the epidermal component (ec). Bar = 250  $\mu$ m. (B): Adjacent mammary gland section hybridized with the ERR-1 sense probe. Bar = 250  $\mu$ m. (C) Transversal section of mammary gland (mg) primordium at E13.5 hybridized with the ER antisense probe showing a strong labelling in the mesenchymal component (mc) of mammary gland and a weak signal in the epidermal part. Bar = 250  $\mu$ m. (D) Adjacent mammary gland section hybridized with the ER sense probe. Bar = 250  $\mu$ m. ep, epithelial component; mc, mesenchymal component; mg, mammary gland.

tion between epithelium and mesenchyme. At E13.5 and E15.5, we observed expression of ERR-1 and ER in the mammary gland primordium. Interestingly, areas of expression of these two related receptors are distinct since ERR-1 mRNAs are detected in the epithelial component (see ec and mg in Fig. 6A), whereas ER mRNAs are present essentially in the mesenchymal part (mc) but lesser in the epithelial (see mc and ec in Fig. 6C). These labellings are specific since no signal was detected with the ERR-1 or ER sense probe (Fig. 6B,D).

#### 2.7. ERR-1 and SF-1/FTZ-F1 act independently on the same DNA target

ERR-1 and the SF-1/FTZ-F1 orphan receptors are reported to bind on the same DNA target (namely the SF-1 responsive element (SFRE); Wilson et al., 1993; Ellinger-Ziegelbauer et al., 1994; Yang et al., 1996; Bonnelye et al., in press) and can activate transcription through it (Honda et al., 1993; Lynch et al., 1993; Bonnelye et al., in press). Moreover, the pattern of ERR-1 expression during embryo-

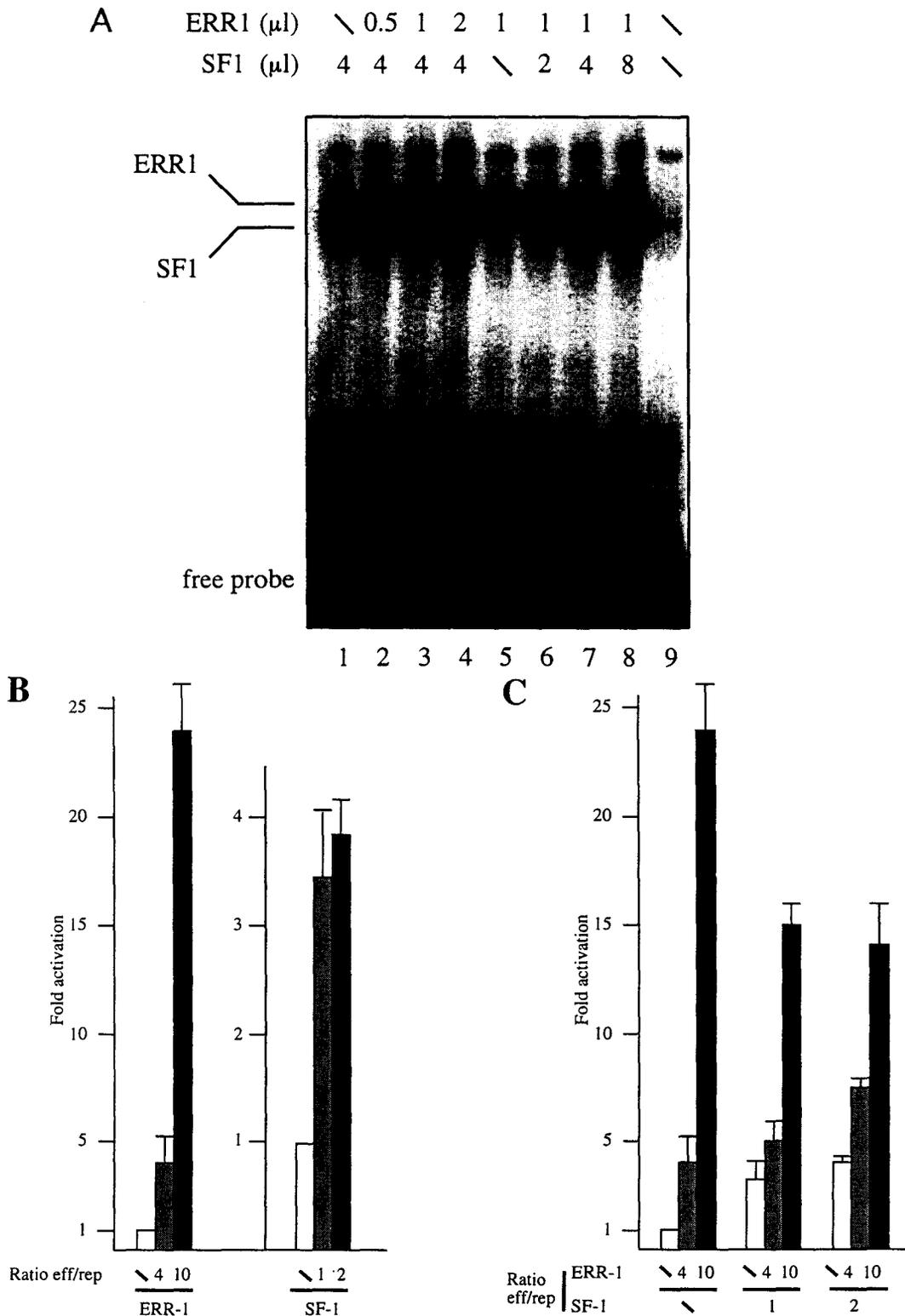


Fig. 7. Interference between ERR-1 and SF-1. (A). EMSAs. Reticulocyte lysates programmed to synthesize ERR-1 or SF-1 (volume of lysate introduced is indicated) were set in contact with a <sup>32</sup>P-labelled SFRE-harboring probe. Lysate volume was completed up to 9  $\mu$ l with unprogrammed extract. Binding actions were electrophoresed on a native gel. Arrows indicate the retarded DNA-protein complexes. Increasing amounts of ERR-1 are introduced together with a fixed quantity of SF-1 in the binding reaction (Lanes 2-4) or conversely (Lanes 6-8). In vitro synthesized SF-1 is represented in lane 1 and ERR-1 in lane 5. Lane 9: unprogrammed (pSG5) reticulocyte alone was introduced in the binding reaction. (B,C) Transient transfection assays. HeLa cells were transfected with plasmid pSFREtkCAT (0.5  $\mu$ g) together with the indicated molar excesses of SF-1, ERR-1 (B) encoding plasmids, or both (C). CAT activities were determined 48 h after transfection and are plotted as the amount of acetylated-<sup>14</sup>C-chloramphenicol relative to the effector-free sample. The graph represents an average of three independent experiments. Note that the scale on (B) is different for SF-1 and ERR-1.

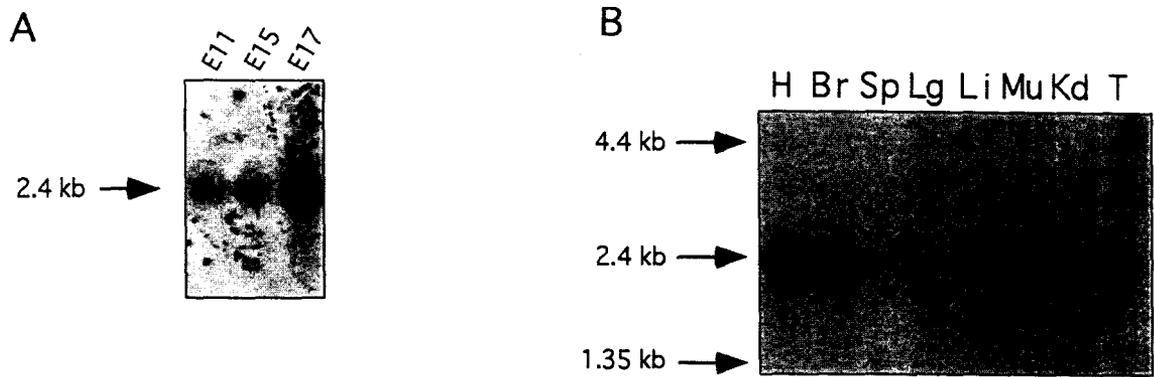


Fig. 8. Expression of ERR-1 in mouse embryo (A) and adult tissues (B) studied by Northern blot. The expected 2.4 kb mRNA is observed. No other band is visible even after long exposure time. H, heart; Br, brain; Sp, spleen; Lg, lung; Li, liver; Mu, skeletal muscles; Kd, kidney; T, testis.

nic development partially overlaps that of the SF-1 orphan receptor since, for example, both genes are expressed in hypothalamus and anterior pituitary (Ikeda et al., 1994). This raises the question of an eventual interference of these proteins at the level of transcriptional activation. To evaluate this possibility, electrophoretic mobility shift assays were first performed to examine the DNA binding behavior of both factors in the presence of each other (Fig. 7A). In vitro synthesized SF-1/FTZ-F1 (lane 1) or ERR-1 (lane 5) individually form a single, specific, DNA-protein complex with  $^{32}$ P-labelled SFRE probe. The two complexes migrate at close but different levels due to their very similar size and are not observed when using unprogrammed reticulocyte lysate as a control (lane 9). Increasing amounts of ERR-1 were introduced together with a fixed quantity of SF-1/FTZ-F1 in the binding reaction (lane 2–4), or conversely (lane 6–8). No additional DNA-protein complex can be observed, suggesting that ERR-1 and SF-1/FTZ-F1 do not heterodimerize but can compete for binding to the SFRE. We next investigated the transactivation capacity of both factors through their cognate probe. To this end, HeLa cells were transiently transfected with plasmid pSFREtk-CAT (that contains multimerized SFRE in front of the HSV tk minimal promoter) together with various amounts of ERR-1- and/or SF-1/FTZ-F1-encoding plasmids (Fig. 7B,C). As expected, both factors, on their own, enhance CAT expression from plasmid pSFREtkCAT, though to a different extent (Fig. 7B). ERR-1 stimulates 24-fold while SF-1/FTZ-F1-induced up-regulation reaches a plateau at 4-fold stimulation. No cumulative effect (either additional or synergistic) can be observed when both proteins are transfected together (Fig. 7C). Rather, the presence of both products leads to a stimulation which is average of those achieved by each individual factor. Taken together, these data therefore show that SF-1/FTZ-F1 and ERR-1 act on the SFRE independently.

### 3. Discussion

We have already demonstrated that ERR-1 is expressed

in bones such as ulna, radius, maxillary bones or vertebrae (Bonnelye et al., in press). Interestingly, this expression coincides spatially and temporally with the onset of bone formation. Indeed, ERR-1 transcripts were only detected in the ossification zones and never in the cartilage regions (Bonnelye et al., in press).

In this report, we show the precise pattern of ERR-1 expression during mouse development. We first observed ERR-1 expression in ES cells by RT-PCR. ERR-1 mRNA has been detected by in situ hybridization experiment, within mesodermal cells of the visceral yolk sac at E8.5 and in heart throughout its development. ERR-1 was also detected in the skeletal muscles at E13.5 and, in a more pronounced manner, at E15.5 and E17.5 as well as in adult tissues. Moreover, Northern blot experiments on myogenic C2 cells confirmed that ERR-1 is expressed in myogenic cells and revealed that this expression increased during the myoblast/myotube formation. In the nervous system we detected a striking ERR-1 expression in differentiating cells. Indeed, ERR-1 appears in the intermediate zone of the spinal cord at E10.5–E17.5 and in the same way in the cephalic vesicles at E13.5. ERR-1 transcripts have also been detected in the differentiating cells of the suprabasal layers of the epidermis at E17.5. ERR-1 is not only expressed in ectodermal or mesodermal tissues, but is also detected in many endodermal derivatives, particularly in all the epithelia of the digestive system.

The data obtained here using embryos are consistent with the results of Northern blot analyses on adult tissues. This is the case for the heart, the skeletal muscles, the nervous system and essentially the spinal cord and in the kidney in which the ERR-1 gene continued to be expressed.

#### 3.1. ERR-1, ERR-2 and ER

Members of the nuclear receptor gene family have been shown to play important functions during development and also to be involved in early developmental stages, as suggested by the detection of estrogen and progesterone receptor mRNA by PCR in mouse preimplantation embryos (Hou et Gorski., 1993). ERR-2, as ERR-1, has been identified as

one of the earliest nuclear receptors induced during mouse preimplantation, suggesting an implication of this receptor in this process. ERR-2 expression can be detected exclusively during a narrow developmental window during mouse embryonic development, starting at E6.5 in trophoblast progenitor cells and remaining high, 1 day later, in the cells which have formed the chorion (Pettersson et al., 1996). At E8.5, ERR-2 signal disappears and is not restored during later developmental stages (E11 and E13). ES cells express both ERR-1 and ERR-2 (Pettersson et al., 1996; our results in the present paper). Their distinct response elements, the ERE for ERR-2 (Yang et al., 1996) and the SFRE for ERR-1 (Bonnelye et al., in press), render them likely to regulate genes through different pathways. However, a cross talk might take place in the case of a promoter bearing both ERE and a SFRE.

The second nuclear receptor which bears close structural relationships to ERR-1 is ER $\alpha$ , which also exhibits different DNA binding preferences but has also been detected in mouse preimplantation embryo (Hou and Gorki, 1993). Since the sizes of the ERR-1 and ER $\alpha$  probes (2.2 kb and 1.8 kb, respectively) are similar, we can approximately compare their expression levels. In the embryo, the patterns of expression of ER $\alpha$  and ERR-1 are partly overlapping, though transcripts can be found in distinct regions of the same structure. This is the case for the olfactory region where ERR-1 is expressed in the epithelium, whereas ER is expressed above it. Another example is the primary mammary bud: ERR-1 transcripts are found in the epithelial part, whereas ER $\alpha$  ones can be observed essentially in the mesenchymal component of the gland. An interesting exception is represented by the expression (although apparently at different levels) of both receptor transcripts in the thalamus, the hypothalamus and the anterior pituitary. The two latter organs control most of the endocrine functions and, among others, the synthesis of estrogens. Since ER $\alpha$  (as a receptor of these hormones) is expressed in the hypothalamo-pituitary axis, it is tempting to speculate that ERR-1 might also have a ligand. In such an hypothesis, the expression of ERR-1 in hypothalamus and pituitary could be part of a feed-back mechanism, as is the case for ER. As for ERR-2, ER $\alpha$  and ERR-1 are likely to regulate different genes due to their distinct response target. However, ER $\alpha$  and ERR-1 have been shown to physically interact (Yang et al., 1996). The pathway controlled by these receptors may be thus interconnected in the cells in which a coexpression occurs. Finally, it could be interesting in the future to compare ERR-1 expression pattern with that of the recently described second estrogen receptor, ER $\beta$ , for which little is known presently (Kuiper et al., 1996).

### 3.2. *ERR-1 and SF-1/FTZ-F1*

The pattern of expression of ERR-1 during development partially overlaps the one described for SF-1 (Ikeda et al., 1994; Ingraham et al., 1994), for example in the hypothala-

mus and the pituitary. Developmentally, the anterior lobe and the tubular part of the pituitary arise from the anterior wall of Rathke's pouch. Later, the epithelium of Rathke's pouch differentiates in endocrinal cells which elaborate hormones. ERR-1 expression was observed in a site of active cellular and vascular proliferation in the anterior wall of the Rathke's pouch. In the pituitary, SF-1 is expressed exclusively in the gonadotrope cells (Barnhart and Mellon, 1994; Ingraham et al., 1994). Though we cannot, for the moment, identify the cell type which expresses ERR-1, the question arises of an eventual interference between both factors concerning transcriptional regulation. Our EMSA results show that ERR-1 and SF-1/FTZ-F1 bind independently on the same DNA target (SFRE; sequence: TCA AGGTCA). This is not surprising since the probe used contains a single core (AGGTCA) responsive element. Nevertheless, we cannot exclude that a tandem arrangement of SFRE on the same DNA probe might not favor the formation of a heterodimer.

The FTZ-F1 gene can be translated in two products, SF-1 and embryonic long terminal repeat-binding protein (ELP; Tsukiyama et al., 1992), which respectively activates and represses transcription (Tsukiyama et al., 1992; Honda et al., 1993; Lynch et al., 1993). The data shown here indicate that SF-1/FTZ-F1 and ERR-1 act independently of each other on their common DNA target when cotransfected in HeLa cells. However, the situation might be different in cells naturally expressing both factors at the same time (if the case exists). ELP is normally expressed very early in development (namely in undifferentiated mouse embryonal carcinoma cells; Tsukiyama et al., 1992) but has recently been shown to be present in very low amounts wherever SF-1 is expressed (Luo et al., 1995). It will be interesting to know whether ELP and ERR-1 could interfere with each other in a physiologically relevant situation.

### 3.3. *ERR-1 and differentiation*

In this report, ERR-1 has been shown to be expressed in muscle cells and in vitro during the myoblast to myotube transition of the C2 cell line. The process of myogenesis involves two events: determination and differentiation. Myoblasts originate during embryogenesis within specific somites. Differentiation is the mechanism by which these committed cells (myoblasts) acquire and express a contractile phenotype. The process of muscle differentiation involves the fusion of dividing myoblasts to form post-mitotic multinucleated cells that have a muscle-specific phenotype. This passage is accompanied by tissue-specific gene expression and developmental regulation of genes. Muscle development is under tight hormonal control and several nuclear receptors such as Rev-erb $\alpha$  (an orphan nuclear receptor), RAR, and THR $\alpha$  play essential roles in muscle differentiation (Muscat et al., 1995). Indeed, Rev-erb $\alpha$  mRNAs have been detected in C2C12 myoblasts and are

down-regulated when cells differentiate into post-mitotic myotubes (Downes et al., 1995). Constitutive expression of Rev-erb $\alpha$  in myogenic cells (C2C12) blocks the induction of myogenin mRNA and suppresses myoD mRNA level (Downes et al., 1995). In C2 cell line retinoic acid enhances the expression of MyoD gene, one of the master genes controlling myogenesis (Albagli-Curiel et al., 1993). The same is observed with thyroid hormone (T3), a positive regulator of muscle development in vivo acting via the thyroid hormone receptor  $\alpha$  (THR $\alpha$ ; Carnac et al., 1992). Indeed, T3 treatment of C2 myoblast enhances MyoD expression and accelerates differentiation.

In this report, we show that ERR-1 is expressed in differentiating cells in both the spinal cord at E10.5–E17.5 and the epidermis at E17.5. ERR-1 expression increases when cell proliferation stops. Nevertheless, the fact that ERR-1 expression decreases in the central nervous system but persists in the spinal cord suggests a specific role of ERR-1 in the spinal cord but not during later development of the brain. The ERR-1 expression pattern in adult brain could be compared with its expression in the embryonic spinal cord which increases during the development. Indeed, the ventricular zone becomes attenuated after E10.5 and eventually disappears; thus, the differentiated cells of the intermediate zone become prominent. Interestingly, ERR-1 expression is much stronger in the ependymal layer (= intermediate zone) of the midbrain compared to its level in the mantle. The latter contains neural tracks, but very few cell nuclei. It is thus likely that ERR-1 mRNA is not transported in the axonal tracks and stay close to the nuclei as we have observed for the spinal cord at E15.5 and E17.5.

Hypotheses for the developmental role of ERR-1 can arise by analogy with other transcription factors displaying comparable patterns of expression. This is the case for the Mad proteins and particularly Mad1, expressed in the intermediate zone of the spinal cord at E10.5 and in the differentiating cells of epidermis at E17.5 (Hurlin et al., 1995). Initial studies examining Mad expression revealed that only very low mRNA and protein levels are present in proliferating myeloid leukemic cells (Ayer and Eisenman, 1993). However, upon differentiation of these cells, Mad RNAs and proteins are induced, apparently as an immediate early response to treatment with differentiating agents (Ayer and Eisenman, 1993; Zervos et al., 1993; Larsson et al., 1994). Mad RNAs and proteins were also found to be induced upon differentiation of primary human foreskin keratinocytes (Hurlin et al., 1994, 1995). Initial characterization of Mad suggested that these proteins could act as inhibitors of cell growth. In conclusion, ERR-1 expression is correlated to the onset of the differentiation process at least in the nervous system, the epidermis and muscles. ERR-1 expression might be set on by proliferation arrest or conversely might induce cell growth inhibition and therefore cell differentiation.

## 4. Materials and methods

### 4.1. RT-PCR

Total RNA was extracted from confluent cells according to standard methods (Maniatis et al., 1989). Samples of total cellular RNA (5  $\mu$ g) were reverse-transcribed using specific downstream ERR-1 and ERR-2 primers and the first strand synthesis kit of Superscript<sup>®</sup> II (Gibco BRL).

PCR were performed to generate amplified fragments of ERR-1 and ERR-2. Primers are located in different exons, as follows: ERR-1 upstream (471–490), TGG TCC AGC TCC CAC TCG CT; ERR-1 downstream (932–953), TGA GAC ACC AGT GCA TTC ACT G; ERR-2 upstream (365–384), TCA AGT GCG AGT ACA TGC TT; ERR-2 downstream (685–704), GAA ATC TGT AAG CTC AGG TA.

The PCR reaction mixture contained cDNA (2  $\mu$ l), 1  $\mu$ l dNTP mix (20 mM), 10 $\times$  PCR buffer with Mg<sup>2+</sup>, 20 pmol primers and 5 U of Taq Gold polymerase from Perkin-Elmer. PCR consisted of 40 cycles of the following: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final elongation step of 7 min at 72°C.

### 4.2. Northern blots and in situ hybridization

We thoroughly checked by Northern blot analysis that the ERR-1 probe we used detects only the expected 2.4 kb mRNA (Fig. 8A) and not the 4.8 kb transcript corresponding to the ERR-2 mRNA. Northern blot analyses were performed using mouse embryo and mouse adult tissues poly A+ RNA Clontech blots (Fig. 8A,B) or poly A+ RNA extracted from C2 myoblastic cell lines (Fig. 2D) and standard procedures (Maniatis et al., 1989). The C2 cells were cultured and differentiated as described (Carnac et al., 1992). The probe encompassed the total mouse ERR-1 cDNA, a generous gift of Vincent Giguère.

E8.5, E10.5, E13.5, E15.5 and E17.5 mouse embryos were fixed at 4°C for 16 h in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dehydrated and embedded in paraffin. Five- $\mu$ m-thick sections were transferred to 3-aminopropyltriethoxysilane (TESPA; Aldrich)-coated slides and dried at 42°C for 2 days. In situ hybridization was performed as described (Quéva et al., 1992; Bonnelye et al., 1994) using <sup>35</sup>S-labelled antisense RNA probe synthesized from a full-length mouse ERR-1 cDNA cloned in Bluescript II KS (Stratagene). To avoid any cross-hybridization with ERR-2 mRNA, hybridization was performed in stringent conditions (60°C). As a negative control, adjacent sections were hybridized with a <sup>35</sup>S-labelled sense RNA probe synthesized from the same template. At the end of the in situ hybridization protocol, nuclei were stained with bisbenzimidazole and appeared blue under fluorescent light. The ERR-1 and ER probes are of similar size, allowing an approximate comparison of their expression levels.

#### 4.3. Transient transfections

HeLa cells were grown in DMEM with 10% fetal calf serum. Cells were transfected according to the calcium precipitation method (Chen and Okoyama, 1987), using plasmid pSG5 as a carrier up to 6 µg of total DNA per sample, and were collected 48 h after transfection. CAT activities were determined and normalized to the total amount of proteins present in the cell lysates. Plasmids pSFREtkCAT, pxFF1r and pSGERR have been described elsewhere (Ellinger-Ziegelbauer et al., 1994; Bonnelye et al., in press).

#### 4.4. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

SFRE probe was labelled with T4 polynucleotide kinase in the presence of  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP. The probe consisted of the following sequence: AGC AGT GGC GAT TTG TCA AGG TCA CAC AGT, in which the SFRE element is italicized. In vitro translations were performed using the rabbit reticulocyte lysate system of the TNT kit (Promega) and pSG5 directing ERR-1 or xFF1r expression. Binding reactions and electrophoresis were performed as described (Vanacker et al., 1993), using the indicated amounts of the translation products.

#### Acknowledgements

We thank Vincent Giguère for the generous gift of the mouse ERR-1 cDNA as well as for sharing unpublished results; and Christophe Quéva and Martine Duterque-Coquillaud for critical reading of the manuscript. We thank Fatima Bouali, Tanja Dittmer, Delphine Grevin and Anne Choteau for technical help. Edith Bonnelye is a recipient of an IPL/Région Nord pas de Calais fellowship. We thank CNRS, IPL and ARC for financial support.

#### References

- Albagli-Curiel, O., Carnac, G., Vandromme, M., Vincent, S., Crépieux, P. and Bonniou, A. (1993) *Differentiation* 52, 201–210.
- Amoroso, E.C. (1958) Placentation, London.
- Ayer, D.E and Eisenman, R.N. (1993) *Cell* 72, 211–222.
- Barnhart, K.M. and Mellon, P.L. (1994) *Mol. Endocrinol.* 8, 878–885.
- Beato, M., Herrlich, P. and Schütz, G. (1995) *Cell* 83, 851–857.
- Bonnelye, E., Vanacker, J.-M., Desbiens, X., Bègue, A., Stéhelin, D. and Laudet, V. (1994) *Cell Growth Differ.* 5, 1357–1365.
- Carnac, G., Albagli-Curiel, O., Vandromme, M., Pinset, C., Montarras, D., Laudet, V. and Bonniou, A. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 1185–1194.
- Chen, C. and Okoyama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745–2752.
- Cserjesi, P. and Olson, E.N. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 4854–4862.
- Downes, M., Carozzi, A.J. and Muscat, G.E.O. (1995) *Mol. Endocrinol.* 9, 1666–1678.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Hihi, A.K., Laudet, V., Keller, H., Wahli, W. and Dreyer, C. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2786–2797.
- Giguère, V., Yang, N., Segui, P. and Evans, R.M. (1988) *Nature* 331, 91–94.
- Green, S., Walter, G., Greene, A., Krust, A., Goffin, E., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. and Chambon, P. (1986) *J. Steroid Biochem.* 24, 77–83.
- Gronemeyer, H. and Laudet, V. (1995) *Protein Profile* 2, 1173–1308.
- Hamilton, B.A., Frankel, W.N., Kerrebrock, A.W., Hawkins, T.L., Fitz-Hugh, W., Kusumi, K., Russel, L.B., Mueller, K.L., Berkel, V.V., Birren, B.W., Kruglyak, L. and Lander, E.S. (1996) *Nature* 379, 736–738.
- Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M. and Omura, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7494–7502.
- Hou, Q., and Gorki, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 94–9464.
- Hurlin, P.T., Quéva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copoland, N.G., Jenkins, N.A. and Eisenman, N. (1995) *EMBO J.* 14, 5646–5659.
- Hurling, P.J., Ayer, D.A., Grandori, C. and Eisenman, R.N. (1994) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Vol. LIX.
- Hurling, P.J., Foley, K.P., Ayer, D.A., Hanahan, D., Eisenman, R.N. and Arbeit, J.A. (1995) *Oncogene* 11, 2485–2501.
- Ikeda, Y., Shen, W.-H., Ingraham, H.A. and Parker, K.L. (1994) *Mol. Endocrinol.* 8, 654–662.
- Ingraham, H.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W.-H., Nachtigal, M.W., Abbud, R., Nilson, J.H. and Parker, K.L. (1994) *Genes Dev.* 8, 2302–2312.
- Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W. (1991) *Science* 254, 707–710.
- Kuiper, G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5925–5930.
- Larsson, L.G., Petterson, M., Oberg, F., Nilsson, K. and Luscher, B. (1994) *Oncogene* 9, 1247–1252.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. and Stéhelin, D. (1992) *EMBO J.* 11, 1003–1013.
- Luo, X., Ikeda, Y., Schlosser, D.A. and Parker, K.L. (1995) *Mol. Endocrinol.* 9, 1233–1239.
- Lynch, J.P., Lala, D.S., Luo, W., Parker, K.L. and White, B.A. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7, 776–786.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995) *Cell* 83, 835–839.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Montagna, W. and Parakkal, P.F. (1974) *The function and structure of skin*, 3rd edn, Academic Press, New York, 433 pp.
- Muscat, G.E.O., Downes, M. and Dowhan, D.H. (1995) *BioEssays* 17, 211–218.
- Nornes, H.O. and Carry, M. (1978) *Brain Res.* 159, 1–16.
- Parker, K.L. and Schimmer, B.P. (1996) *Trends Endocrinol. Metab.* 7, 203–207.
- Petersson, K., Svensson, K., Mattsson, R., Carlsson, B., Ohlsson, R. and Berkenstam, A. (1996) *Mech. Dev.* 54, 211–213.
- Pierce, E.T. (1973) Time of origin of neurons in the brain of mouse. In Ford, D.H. (ed.), *Neurological Aspects of Maturation and Aging*, Progress in Brain Research Vol. 40, Elsevier, Amsterdam, pp. 53–65.
- Quéva, C., Ness, S.A., Grasser, F.A., Graf, T., Vandembunder, B. and Stéhelin, D. (1992) *Development* 114, 125–133.
- Tsukiyama, T., Ueda, H., Hirose, S. and Niwa, O. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 1286–1291.
- Vanacker, J.-M., Laudet, V., Adelmant, G., Stéhelin, D. and Rommelaere, J. (1993) *J. Virol.* 67, 7668–7672.
- Wiley, S.R., Kraus, R.J., Zuo, F., Murray, E.E., Loritz, K. and Mertz, J.E. (1993) *Genes Dev.* 7, 2206–2219.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 5794–5804.
- Yang, N., Shigeta, H., Shi, H. and Teng, C.T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 5795–5804.
- Zervos, A.S., Gyuris, J. and Brent, R. (1993) *Cell* 72, 223–232.

## Discussion de l'article 3

### 1) ERR-1 et ERR-2.

La majorité des récepteurs nucléaires jouent un rôle au cours du développement et, certains pourraient même intervenir dans les tous premiers stades embryonnaires. C'est le cas de ERR-1 et ERR-2 qui ont été identifiés dans les cellules ES qui rappelons-le sont des cellules dérivant directement des blastomères du blastocyste non encore implanté dans la muqueuse utérine. Ainsi, ils peuvent être considérés comme faisant partie des récepteurs nucléaires les plus précocement exprimés qui peuvent jouer un rôle au cours des tous premiers processus du développement. C'est ce qui a été démontré pour ERR-2 et qui commence à l'être pour ERR-1.

En effet en ce qui concerne ERR-2, les premières données expérimentales décrivant l'expression de ERR-2 dans le chorion au cours du développement suggéraient déjà que ce récepteur pouvait jouer un rôle très précocement au cours du développement embryonnaire (Pettersson et al, 1996). Ceci a été confirmé tout récemment par l'équipe de Vincent Giguère qui a réalisé par recombinaison homologue, l'inactivation du gène ERR-2 chez la souris (Luo et al, 1997). L'absence de ERR-2 s'est alors révélée responsable de l'accumulation de cellules trophoblastiques géantes provoquant un mauvais développement du chorion et par voie de conséquence de fortes anomalies dans la formation du placenta. Ces malformations placentaires engendrées par l'absence de ERR-2, se sont alors avérées responsable de la mort des embryons à E10,5 (Luo et al, 1997). ERR-2 est donc essentiel pour la mise en place du placenta et donc pour le bon déroulement du développement embryonnaire précoce.

En ce qui concerne le récepteur ERR-1, les connaissances à propos de sa fonction dans le développement embryonnaire précoce sont moins avancées comparée à celles sur ERR-2. Cependant des résultats tout récents et non encore publiés nous poussent à penser que le rôle de ce gène pourrait être essentiel dès les premiers stades du développement. Premièrement, nous avons montré dans cet article que ERR-1 était exprimé très tôt à E8,5 dans le feuillet mésodermique appelé splanchnopleure à partir duquel vont se former plusieurs dérivés mésodermiques comme le coeur et les muscles. Ainsi ERR-1 pourrait intervenir dans la formation de ces tissus dans lequel d'ailleurs il s'exprime tout au long du développement

embryonnaire. Deuxièmement, d'après les résultats de l'équipe de Vincent Giguère, ERR-1 semble aussi être exprimé dans le placenta au moment où ERR-2 disparaît, à savoir lors de la fusion chorion-allantoïde qui est à la base de la formation du placenta. ERR-1 et ERR-2 pourraient donc, tous les deux contribuer à la formation du placenta. De plus la prise de relais par ERR-1 au niveau du placenta quand ERR-2 disparaît pourrait suggérer l'existence d'une possible régulation croisée entre ces deux récepteurs.

De plus, nous avons isolé tout récemment, le gène codant ERR-1 du poisson-zèbre (données non publiées). Les premières données d'expression montrent que chez le poisson-zèbre, ERR-1 est très exprimé lors de la gastrulation qui est l'étape du développement où les feuillets embryonnaires se mettent en place. ERR-1, à la gastrulation, est alors exprimé au niveau de la marge où les cellules s'invaginent et vont former le feuillet méso-endodermique du poisson. ERR-1 pourrait donc intervenir dans la mise en place des feuillets embryonnaires au cours de ce phénomène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'étudier les conséquences que pourraient engendrer la sur-expression de ce récepteur au cours du développement embryonnaire du poisson. Pour cela, en collaboration avec Christine et Bernard Thisse à l'IGBMC de Strasbourg, nous avons injecté l'ARNm de ERR-1 dans des oeufs au stade deux blastomères. Nous avons pu alors nous rendre compte que la marge à la gastrulation, où ERR-1 avait été initialement détecté, était fortement désorganisée après l'injection des messagers ERR-1. De plus, nous avons pu également observer la présence d'un grand nombre d'anomalies du développement vers 24 heures et 48 heures de développement. En effet, plusieurs embryons présentaient un élargissement de l'axe antéro-postérieur ainsi que des déformations du tronc. Pour finir la sur-expression de ERR-1 pouvait même conduire à l'absence totale de structures cérébrales à 48 heures. Ces résultats sont encore préliminaires. Ils nous reste à déterminer les structures réellement touchées par la sur-expression de ERR-1 de manière à mieux définir son rôle biologique au cours du développement précoce du poisson. Cependant, ces résultats nous incitent à penser que ERR-1 pourrait jouer un rôle important au cours du développement précoce et que les anomalies observées à 24 et 48 heures soient directement liées à la dérégulation de son expression au cours de la gastrulation.

## 2) ERR-1 et ER dans la glande mammaire.

Nous avons montré que ERR-1 était exprimé très tôt dans la différenciation de la glande mammaire. Ainsi les transcrits ERR-1 ont été détectés dans la partie épithéliale du bourgeon primaire mammaire alors que ER $\alpha$  est très fortement exprimé dans la partie mésenchymateuse du bourgeon à E13,5 et E15,5. De plus, comme nous l'avons discuté précédemment, ERR-1 est induit dans la glande mammaire, au cours de la gestation et de la lactation. Il semblerait donc que ERR-1 puissent intervenir dans le développement embryonnaire de la glande mammaire mais aussi, dans les processus permettant d'induire les modifications physiologiques essentielles de la glande mammaire, au cours de la gestation et de la lactation.

Il nous reste à déterminer, maintenant, le rôle de ERR-1 dans ces mécanismes et en particulier les gènes cibles de ERR-1 pouvant intervenir dans le fonctionnement de la glande mammaire. Des résultats récents, nous permettent de proposer deux gènes cibles potentiels capables de jouer un rôle dans la fabrication du lait. Tout d'abord, la lactoferrine, une protéine présente dans le lait qui peut intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire et dans la croissance. Le promoteur de la lactoferrine est activé par ER et possède dans ses séquences un élément SFRE sur lequel la fixation de ERR-1 est démontré. Une fois ERR-1 fixé, on observe alors une augmentation de l'activation médiée par les oestrogènes *via* ER. ERR-1 serait donc capable de potentialiser les effets médiés par des oestrogènes et donc d'augmenter la production de lactoferrine (Yang et al, 1996). De plus les mêmes auteurs montrent que ERR-1 et ER pourraient interagir par des contacts protéines-protéines. On peut donc imaginer que la formation du complexe ERR-1-ER soit à l'origine de l'activation synergique de gènes cibles. Ainsi, ERR-1 interviendrait dans la potentialisation de l'activation médiée par les oestrogènes.

Enfin, tout récemment, un autre gène cible dont le produit est indispensable pour la fabrication du lait a été suggéré (Johnston et al, 1997). En effet, un élément SFRE a été identifié dans le promoteur de la prolactine sur lequel ERR-1 peut se fixer (Johnston et al, 1997). En revanche nous ne savons pas, contrairement à la lactoferrine, si ERR-1 peut effectivement réguler l'expression de la prolactine. Celle-ci est synthétisée par les cellules galactophores de l'hypophyse et induit la fabrication de la caséine, une des premières protéines du lait à être



synthétisée. La concentration en prolactine détectée dans le sérum augmente au cours de la gestation et de la lactation et c'est la production d'oestrogènes au cours de ces processus qui induirait cette augmentation. La présence d'un site SFRE dans le promoteur de la prolactine capable d'être reconnu par ERR-1 et le fait que ERR-1 soit induit au cours de la gestation et de la lactation peut aussi faire de ERR-1 une protéine capable d'induire l'expression de la prolactine et d'expliquer sa concentration au cours de la lactation et de la gestation.

On pourrait aussi imaginer que la production de la prolactine induite au cours de la gestation et de la lactation par les oestrogènes ne dépende pas de ERR-1. Mais au vue des effets de ERR-1 sur la potentialisation de l'activité des oestrogènes sur le promoteur de la lactoferrine, on peut aussi suggérer que la fixation de ERR-1 sur le promoteur de la prolactine induise la même régulation (Yang et al, 1996). ERR-1 jouerait donc un rôle dans la potentialisation des effets médiés par les oestrogènes entraînant ainsi une augmentation de la production de ces protéines, indispensables dans le cas présent, pour la lactation. Ceci cependant n'est qu'une hypothèse car nous ne savons pas, contrairement à la lactoferrine, si ERR-1 peut effectivement réguler l'expression de la prolactine. En conclusion, ERR-1 de par son expression et ses gènes cibles, réel et putatif, pourrait donc jouer un rôle dans la physiologie de la glande mammaire.

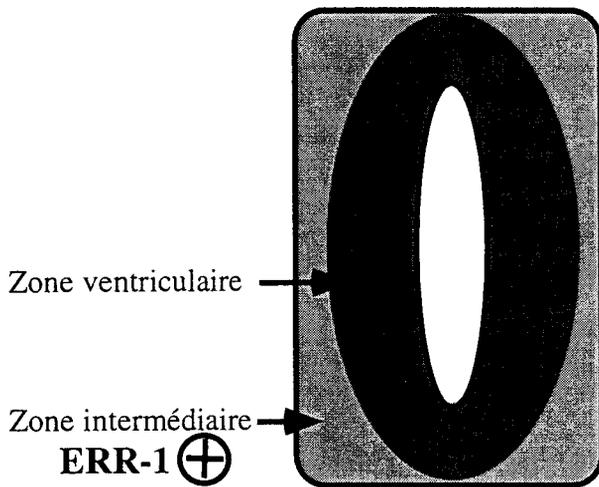
### **3) ERR-1 et la différenciation cellulaire.**

#### **3.1) ERR-1 et la différenciation nerveuse et épidermique.**

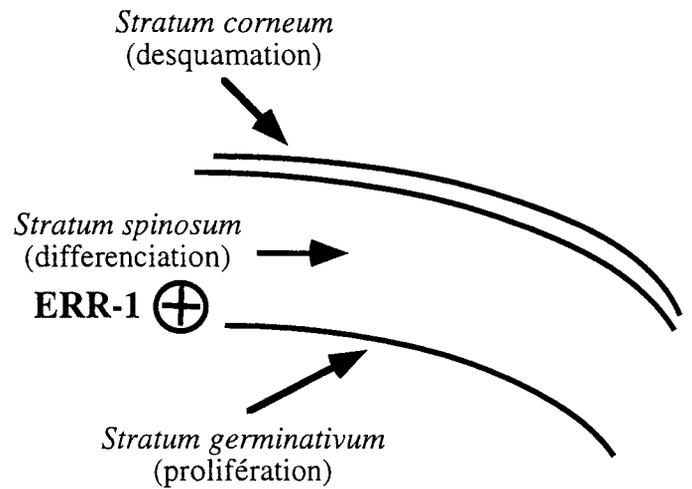
Nous avons montré que ERR-1 était exprimé au cours de la différenciation de la moelle épinière de E10,5 à E17,5 et de l'épiderme. Dans ces deux systèmes, ERR-1 est exprimé une fois la prolifération cellulaire arrêtée.

Ainsi à E10,5, la moelle épinière peut être divisée en deux régions fonctionnelles, la zone ventriculaire et la zone intermédiaire (revue dans Angevine, 1970). La zone ventriculaire est caractérisée par la présence des précurseurs des neurones et des cellules gliales en cours de prolifération (Nornes et Carry, 1978). Quand ces précurseurs vont se différencier, ils vont stopper leur division mitotique et migrer dans la zone intermédiaire. ERR-1 est exprimé dans les cellules post-mitotiques en cours de différenciation dans la zone intermédiaire ventrale et dorsale

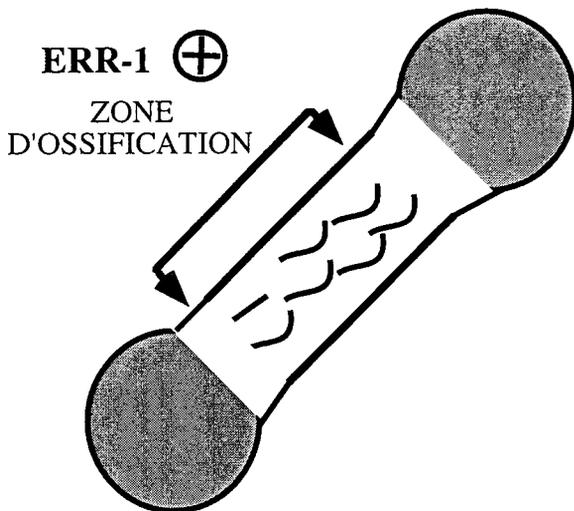
**A** Moelle épinière:  
Zone intermédiaire



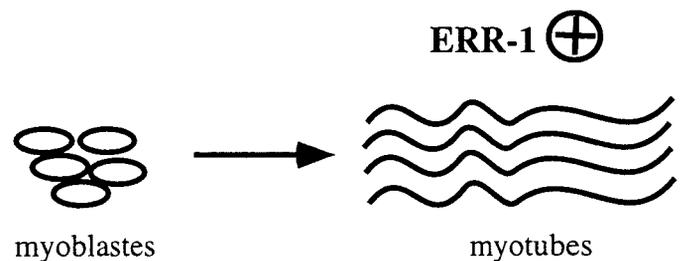
**B** Epiderme: *Stratum Spinosum*



**C** OS : Ostéoblastes



**D** Muscle: myotubes



**Figure 49:** ERR-1 et la différenciation. Représentation schématique du profil d'expression de ERR-1 qui est associé à la différenciation cellulaire dans la moelle épinière (zone intermédiaire) (A), dans l'épiderme (*Stratum spinosum*) (B), dans l'os (Ostéoblastes) (C) et dans le muscle (augmentation de l'expression de ERR-1 dans les myotubes) (D).

de la moelle épinière (**figure 49A**). Plus tard au cours du développement, la zone ventriculaire disparaît laissant la place à la zone intermédiaire où ERR-1 continue d'être exprimé.

Ce phénomène de différenciation cellulaire est aussi observable dans l'épiderme qui est stratifié et constitué de plusieurs couches cellulaires qui sont caractérisées par des cellules en mitoses (*stratum germinativum*), des cellules en cours de différenciation (*stratum spinosum*) et enfin une couche cellulaire qui est caractérisée par la mort cellulaire, la desquamation (*stratum corneum*) (**figure 49B**). ERR-1 est uniquement exprimé dans le *stratum spinosum* qui est caractérisé par la présence des cellules à épines qui sont des kératinocytes (ou couche du corps muqueux de Malpighi). Ces cellules sont en cours de différenciation et l'expression de ERR-1 augmente très fortement entre E13,5 et E17,5.

En conclusion que ce soit dans la moelle épinière ou l'épiderme, ERR-1 est exprimé dans des cellules post-mitotiques qui sont en cours de différenciation. Ce profil d'expression a été mis en évidence pour d'autres facteurs de transcription dont l'expression comme celle de ERR-1 n'est détectable que dans des cellules qui viennent de quitter le cycle cellulaire et qui commencent à se différencier. C'est le cas des protéines Mad.

### 3.2) Les protéines Mad et la différenciation.

Une hypothèse dans la fonction de ERR-1 au cours du développement nous a été donnée par l'analogie du profil d'expression entre ERR-1 et le facteur Mad1. En effet, Mad1 est exprimé dans la zone intermédiaire de la moelle épinière à E10,5 et dans les cellules en cours de différenciation de l'épiderme à E17,5 comme ERR-1 (Hurlin et al, 1995a). Mad1 est un facteur de transcription qui appartient à la famille des facteurs Mad. Ces facteurs agissent comme des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Plus précisément ils sont capables d'hétérodimériser avec les facteurs de la famille Max qui sont aussi capables de former un complexe avec l'oncogène c-Myc. La formation du complexe c-Myc:Max a pour conséquence l'activation de la prolifération cellulaire. Inversement la formation du complexe Mad:Max stoppe l'effet prolifératif de c-Myc (Ayer et Eisenman, 1993; Ayer et al, 1993). Les facteurs Mad agissent donc comme des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. De plus les études portant sur l'expression des Mad ont toujours associées l'expression de ces facteurs avec la différenciation

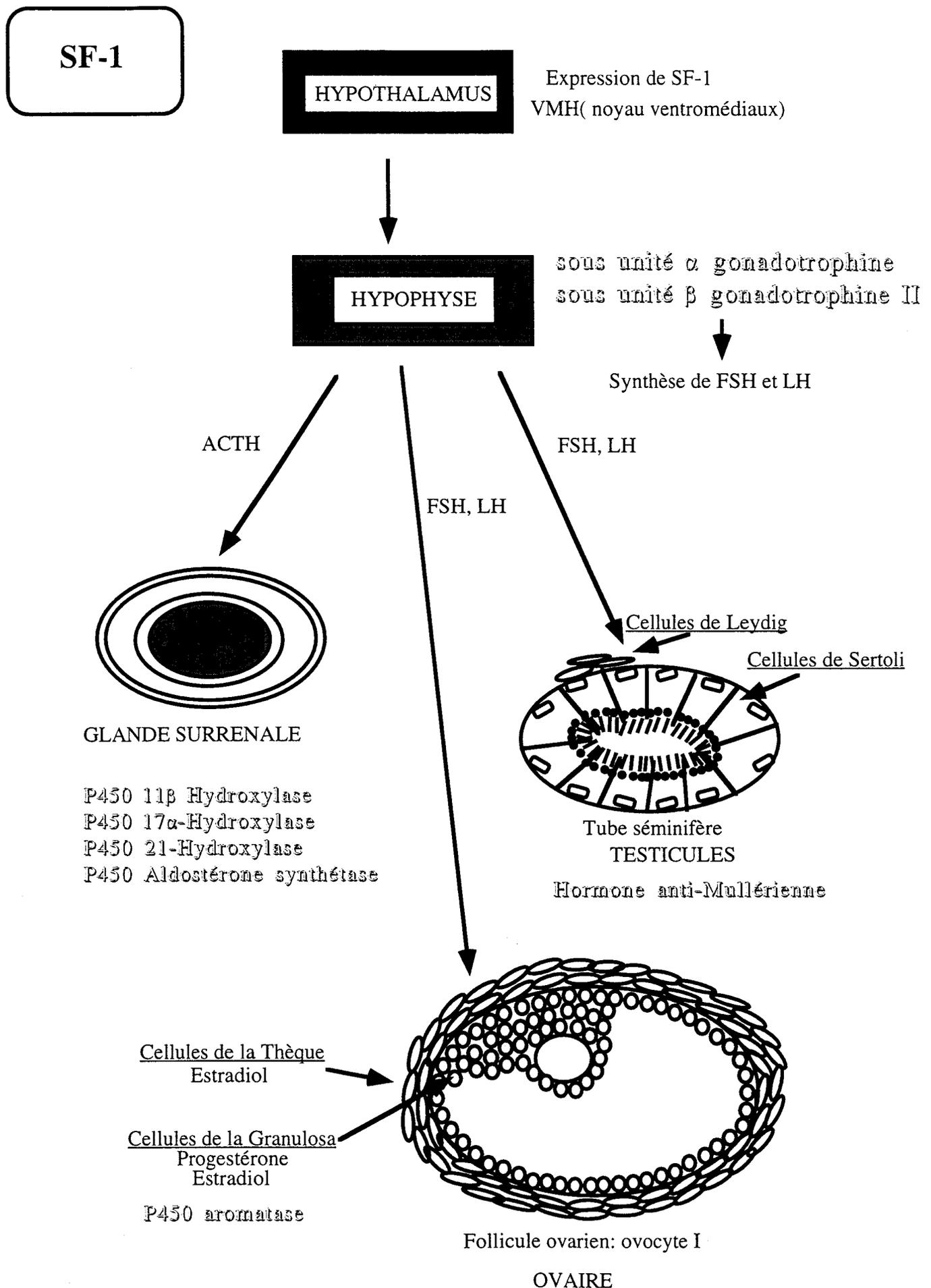
cellulaire. En effet, ces travaux ont permis de montrer que l'induction de la différenciation de cellules leucémiques provoquait l'expression des facteurs Mad alors que peu de messagers Mad avaient été, au préalable, détectés dans ces cellules en prolifération (Ayer et Eisenman, 1993). De plus *in vivo*, ces facteurs ont uniquement été détectés dans des cellules en cours de différenciation que ce soit dans les kératinocytes ou dans l'épithélium intestinal humain (Hurlin et al, 1995 b). L'identité du profil d'expression de ERR-1 avec un des membres de la famille Mad, dans la moelle épinière et l'épiderme, nous semble être un bon argument pour dire que ERR-1 pourrait être associé à la différenciation cellulaire.

De plus, il ne faut pas oublier que ERR-1 est aussi exprimé dans le tissu osseux (ostéoblastes, dès l'apparition de centres d'ossification) et dans le tissu musculaire (essentiellement dans les myotubes) ce qui montre que l'expression de ERR-1 dans ces systèmes est également associée à la différenciation cellulaire (**figure 49 C et D**).

Tout récemment l'équipe de Vincent Giguère a décrit le profil d'expression de ERR-1 au cours du développement embryonnaire de la souris. Elle a montré que ERR-1 était exprimé dans le coeur, dans l'épithélium intestinal et le tissu adipeux ce que nous avons, nous aussi, mis en évidence. De plus, ces mêmes auteurs ont montré dans le tissu adipeux, que l'expression de ERR-1 était corrélée avec la différenciation adipocytaire (Sladek et al, 1997). En effet, une forte augmentation de l'expression de ERR-1 a été détectée lors de la différenciation des adipocytes dans le modèle des cellules 3T3-L1. De plus il a identifié un gène cible, l'acyl Coenzyme A deshydrogénase, une enzyme qui intervient dans le métabolisme des acides gras (Sladek et al, 1997). En conclusion, notre étude et celle de l'équipe de Vincent Giguère, sur l'expression de ERR-1, montrent que le profil d'expression de ERR-1 est en liaison avec la différenciation cellulaire. La fonction de ERR-1 dans ces systèmes reste encore à définir et il va falloir, dans un premier temps, déterminer si il joue le rôle d'un inhibiteur de la différenciation comme Mad1 ou au contraire le rôle d'un inducteur.

#### **4) ERR-1 et SF-1 dans la stéroïdogénèse.**

ERR-1 comme SF-1 est capable de se fixer sur un SFRE. Ceci suggère donc de possibles interférences entre ces deux récepteurs sur les SFRE présents dans les promoteurs de



**Figure 50:** Représentation des différents gènes cibles de SF-1 au cours de la stéroïdogénèse indiqués en caractères ombrés. Ces gènes sont également des cibles potentielles de ERR-1.

gènes cibles (Wilson et al, 1993). De nombreux gènes cibles de SF-1 ont été identifiés, à ce jour, ce qui a contribué à montrer que SF-1 pouvait jouer un rôle majeur dans la stéroïdogénèse (revue dans Saez et Durand, 1994) (**figure 50**). Plus précisément SF-1 est capable d'activer l'expression de plusieurs enzymes intervenant dans la synthèse de stéroïdes dans les glandes surrénales (revue dans Saez et Durand, 1994). SF-1 est aussi capable d'activer la formation des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotrophines qui vont permettre de synthétiser l'hormone folliculo-stimulante FSH et l'hormone lutéinisante LH, qui sont des hormones indispensables pour l'induction de la synthèse des stéroïdes dans les appareils génitaux (Barnhart et Mellon, 1994; Liu et al, 1997). Ce récepteur peut réguler, dans les cellules de Sertoli, l'expression de l'hormone anti-müllérienne (AMH), responsable chez l'homme de la régression des canaux de Müller (Shen et al, 1994). Enfin SF-1 est aussi capable de réguler l'expression de la P450 aromatasase qui intervient dans la synthèse de l'oestradiol dans les cellules de la granulosa dans le follicule ovarien (Lynch et al, 1993). Il sera donc être intéressant d'étudier l'activité de ERR-1 sur ces promoteurs qui contiennent tous un élément SFRE.

La régulation de ces gènes par ERR-1 est d'autant plus envisageable que ERR-1 et SF-1 sont co-exprimés dans certains tissus. En effet, des résultats récents, nous ont permis de montrer que ERR-1 est exprimé, comme SF-1, dans les cellules de Sertoli dans les testicules et dans les cellules de la granulosa dans les ovocytes (Ikeda et al, 1993; Bonnelye, données non publiées). ERR-1 est aussi exprimé dans l'hypothalamus à E13,5 et dans la poche de Rathke qui va donner naissance à l'antéhypophyse. Les promoteurs de l'AMH (cellules de Sertoli), de la P450 aromatasase (granulosa dans le follicule ovarien) et des sous-unités des gonadotrophines (hypothalamus (FSH) et hypophyse (LH)) sont donc des cibles potentielles gènes de ERR-1.

Des travaux récents sur le promoteur de l'ostéopontine qui contient sept éléments SFRE plus ou moins parfaits, ont permis à Jean-Marc Vanacker dans l'équipe de se rendre compte que ERR-1 reconnaissait un SFRE sur lequel SF-1 est capable de se fixer mais très faiblement. L'inverse a aussi été observé, c'est-à-dire une fixation forte de SF-1 sur certains éléments et faible de ERR-1 sur les mêmes éléments. Il semblerait donc que ERR-1 et SF-1 reconnaissent chacun des sites SFRE préférentiels légèrement différents. Ceci suggère donc que ERR-1 ne pourra peut-être pas reconnaître tous les sites SFRE reconnus par SF-1 sur le

promoteur de ces gènes cibles. Il est cependant tentant de tester l'activité de ERR-1 sur les gènes cibles de SF-1. S'il s'avère que ERR-1 active effectivement ces promoteurs, il sera alors intéressant de comparer l'activation de ERR-1 par rapport à celle produite par SF-1.

Nous avons effectivement montré dans les cellules Hela, que les deux récepteurs, ERR-1 et SF-1, sont capables d'activer différemment un gène rapporteur *via* leur fixation sur des sites SFRE clonés en amont de ce gène. En effet, sur ce gène rapporteur et dans les conditions utilisées, ERR-1 est capable d'activer 25 fois alors que SF-1 n'active que 4 fois. De plus si l'on co-transfecte ERR-1 avec des taux croissant de SF-1, l'activation médiée par ERR-1 diminue. Il semble donc que ERR-1 et SF-1 puissent agir indépendamment sur le même élément de réponse. On peut donc imaginer que l'expression de ERR-1 puisse provoquer l'augmentation de l'expression des gènes cibles de SF-1.

Ainsi, si nous considérons la gestation, au cours de laquelle l'expression de ERR-1 est induite dans les glandes mammaires, on peut imaginer que l'expression de ce gène le sera également, au cours de ce processus, dans l'hypothalamus, l'hypophyse et les ovaires. Si c'est le cas, ceci pourrait participer à l'augmentation de la synthèse de la FSH, de la LH et des oestrogènes observée au cours de la gestation et de la lactation. En effet, si ERR-1 est capable de se fixer sur les sites SFRE présents dans chacun des promoteurs des gènes cibles de SF-1, l'augmentation de l'expression de ERR-1 au cours de la gestation et de la lactation pourrait engendrer une sur-expression de ces gènes.

En conclusion, il sera donc intéressant d'étudier l'activité de ERR-1 sur ces différents gènes cibles et ainsi, par la même occasion, de déterminer si ERR-1 est aussi capable de jouer un rôle dans la stéroïdogénèse.

## **REFERENCES**

- **Adelmant,G.**, A.Bègue, D.Stéhelin and V.Laudet. A functional Rev-erb $\alpha$  responsive element located in the human Rev-erb $\alpha$  promoter mediates a repressing activity. Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1996) 93 : 3553-3558.
- **Albagli-Curiel,O.**, G.Carnac, M.Vandromme, S.Vincent, P.Crépieux and A.Bonnieu. Serum-induced inhibition of myogenesis is differentially relieved by retinoic acid and triiodothyronine in C2 murine muscle cells. Differentiation (1993) 52 : 201-210.
- **Ali,S.**, D.Metzger, J.M.Bornert and P.Chambon. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. The EMBO J. (1993) 12 : 1153-1160.
- **Angevine Jr,J.B.**, D.Bodian, A.J.Coulombre, M.V.Edds Jr, V.Hamburger, M.Jacobson, K.M.Lyser, M.C.Prestige, R.L.Sidman, S.Varon. Embryonic vertebrate central nervous system : revised terminology. Anat.Rec. (1969) 166 : 257-261.
- **Arnold,S.F.**, J.D.Obourn, H.Jaffe and A.C.Notides. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by Src family tyrosine kinases in vitro. Mol.Endocrinol. (1995) 9 : 24-33.
- **Aubin,J.E. and F.Liu.** The osteoblast lineage. Principles of Bone Biology (1996) 5 : 51-67.
- **Ayer,D.E. and R.N.Eisenman.** A switch from myc:max to mad:max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. Genes & Development (1993) 7 : 2110-2119.
- **Ayer,D.E.**, L.Kretzner and R.N.Eisenman. Mad : a heterodimeric partner for max that antagonizes myc transcriptional activity. Cell (1993) 72 : 211-222.
- **Barettino,D.**, Vivanco Ruiz,M.D.M. and H.G.Stunnenberg. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. The EMBO J. (1994) 13 : 3039-3049.
- **Barnhart,K.M. and P.L.Mellon.** The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the Glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene in pituitary gonadotropes. Mol.Endo. (1994) 8 : 878-885.

- **Blanco,G.C.G.**, Wang,I.M., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., O'Malley,B.W., Jurutka,P.W., Hausler,M.R. and Ozato,K. Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1995) 92 : 1535-1539.
- **Bonnelye,E. et V.Laudet.** Les gènes chevauchants. Médecine/Science (1994) 10 : 805-816.
- **Bonnelye,E.**, J.M.Vanacker, T.Dittmar, A.Bègue, X.Desbiens, D.T.Denhardt, J.E.Aubin, V.Laudet and B.Fournier. The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development. Molec.Endocrinol. (1997) 11 : 905-916.
- **Bonnelye,E.**, J.M.Vanacker, N.Spruyt, S.Alric, B.Fournier, X.Debiens and V.Laudet. Expression of the estrogen-related receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development. Mechanisms of Development (1997) 65 : 71-85.
- **Bonnelye,E.**, J.M.Vanacker, X.Desbiens, A.Bègue, D.Stéhelin and V.Laudet. Rev-erb $\beta$ , a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. Cell Growth and Differentiation (1994) 5 : 1357-1365.
- **Bourguet,W.**, M.Ruff, P.Chambon, H.Gronemeyer and D.Moras. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . Nature (1995) 375 : 377-382.
- **Brzowski,A.M.**, A.C.W.Pike, Z.Dauter, R.E.Hubbard, T.Bonn, O.Engström, L.Öhman, G.L.Greene, J.A.Gustafsson and M.Carlquist. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature (1997) 389 : 753-758.
- **Buckingham,M. and S.Tajbakhsh.** Expression des facteurs myogéniques chez la souris : myf-5, premier membre de la famille des gènes MyoD à être transcrit au cours de la formation du muscle squelettique. C.R.Acad.Sci. Paris, Sciences de la Vie/Life sciences (1993) 316 : 1032-1039.
- **Bunone,G.**, P.A.Briand, R.J.Miksicek and D.Picard. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involved the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. The EMBO J. (1996) 15 : 2174-2183.

- **Burke,L.**, M.Downes, A.Carozzi, V.Giguère and G.E.O.Muscat. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb $\beta$  is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region : functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* (1996) 24 : 3481-3489.
- **Burke,L.J.**, M.Downes, V.Laudet and G.E.O.Muscat. Functional characterisation of the domains in the Rev-erb family required for interaction with the nuclear hormone receptor corepressors : N-CoR and the RIP13 variants interact with TAFII32, evidence for a repression mechanism. (1997) Soumis.
- **Carlberg,C.**, I.Bendik, A.Wyss, E.Meier, L.J.Sturzenbecker, J.F.Grippe and W.Hunziker. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* (1993) 361 : 657-660.
- **Carlberg,C.**, R.H.van Huijsduijnen, J.K.Staple, J.F.DeLamarter and M.Becker-André. RZR $\alpha$ , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and heterodimer. *Mol.Endocrinol.* (1994) 8 : 757-770.
- **Carnac,G.**, O.Albalgi-Curiel, M.Vandromme, C.Pinset, D.Montaras, V.Laudet and A.Bonnieu. 3,5,3' - triiodothyronine positively regulates both MyoD1 gene transcriptoin and terminal differentiation in C2 myoblasts. *Mol.Endocrinol.* (1992) 6 : 1185-1194.
- **Cavaillès,V.**, Dauvois,S., Danielian,P.S. and M.G.Parker. Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1994) 91 : 10009-10013.
- **Chakravarti,D.**, V.J.LaMorte, M.C.Nelson, T.Nakajima, I.G.Schulman, H.Juguilon, M.Montminy, R.M.Evans. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* (1996) 383 : 99-103.
- **Chawla,A. and M.A.Lazar.** Induction of Rev-ErbA $\alpha$ , an orphan receptor encoded on the opposite strand of the  $\alpha$ -thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.* (1993) 268 : 16265-16269.
- **Chen,J.D. and Evans.R.M.** A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* (1995) 377 : 454-457.

- **Dahlman-Wright,K.**, H.Baumann, I.J.McEwan,T.Almlöf, A.P.H.Wright, J.A.Gustafsson and T.Härd. Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor.Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1995) 92 : 1699-1703.
- **Dahlman-Wright,K.**, T.Almlöf, I.J.McEwan, J.A.Gustafsson and A.P.H.Wright. Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1994) 91 : 1619-1623.
- **Danielian,P.S.**, White,R., Lees,J.A. and M.G.Parker. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. The EMBO J. (1992) 11 :1025-1033.
- **Danielsen,M.** Structure and function of the glucocorticoid receptor. In Nuclear Hormone Receptors : Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities. Malcom G.Parker Ed., Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London (1991).
- **Danielsen,M.**, L.Hinck and G.M.Ringold. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. Cell (1989) 57 : 1131-1138.
- **Davis,I.J. and L.F.Lau.** Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. Mol.Cell.Biol. (1994) 14 : 3469-3483.
- **Davis,I.J.**, Hazel,T.G., Chen,R.H., Blenis,J. and L.F.Lau. Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. Mol.Endocrinol. (1993) 7 : 953-964.
- **Denhardt,D.T. and X.Guo.** Osteopontin : a protein with diverse functions. The FASEB J. (1997) 7 : 1475-182.
- **Desvergne,B.** How to thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements ? Mol.Cell.Endocrinol. (1994) 100 : 125-131.
- **Devchand,P.R.**, H.Keller, J.M.Peters, M.Vasquez, F.J.Gonzalez and W.Wahli. The PPAR $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammation control. Nature (1996) 384 : 39-43.

- **Downes, M.**, A.J.Carozzi and G.E.O.Muscat. Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erbA $\alpha$ , inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myoD gene family. *Mol.Endocrinol.* (1995) 9 : 1666-1678.
- **Downes, M.**, L.J.Burke and G.E.O.Muscat. Transcriptional repression by Rev-erbA $\alpha$  is dependent on the signature motif and helix5 in the ligand binding domain : silencing does not involve an interaction with N-CoR. *Nucleic Acids Res.* (1996) 24 : 3490-3498.
- **Downes, M.**, L.J.Burke, P.J.Bailey and G.E.O.Muscat. Two receptor interaction domains in the corepressor, N-CoR/RIP-13, are required for an efficient interaction with Rev-erbA $\alpha$  and RVR : physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Res.* (1996) 24 : 4379-4386.
- **Dreyer, C.**, Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and W.Wahli. Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* (1992) 68 : 879-887.
- **Dumas, B.**, H.P.Harding, H.S.Choi, K.A.Lehmann, M.Chung, M.A.Lazar and D.D.Moore. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol.Endocrinol.* (1994) 8 : 996-1005.
- **Durand, B.**, Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. and P.Chambon. Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor : presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *The EMBO J.* (1994) 13 : 5370-5382.
- **Dussault, I.** and **V.Giguère.** Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR $\alpha$  and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol.Cell.Biol.* (1997) 17 : 1860-1867.
- **Enmark, E.** and **J.A.Gustafsson.** Orphan nuclear receptors - The first eight years. *Mol.Endocrinol.* (1996) 10 : 1293-1307.
- **Enmark, E.**, T.Kainu, M.Pelto-Huikko and J.A.Gustafsson. Identification of a novel member of the nuclear receptor superfamily which is closely related to Rev-erba. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (1994) 204 : 49-56.

- **Eriksen,E.F.**, D.S.Colvard, N.J.Berg, M.L.Graham, K.G. Mann, T.C.Spelsberg, B.L.Riggs. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* (1988) 241 : 84-86.
- **Escriva,H.**, R.Safi, C.Hänni, M.C.Langlois, P.Saumitou-Laprade, D.Stéhelin, A.Capron, R.Pierce and V.Laudet. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1997) 94 : 6803-6808.
- **Evans,R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (1988) 240 : 889-895.
- **Folkers,G.E.**, B.J.M. van der Leede and P.T.van der Saag. The retinoic acid receptor- $\beta$ 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand-binding domain. *Mol.Endocrinol.* (1993) 616-626.
- **Forman,B.M. and H.H.Samuels.** Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors : the regulatory zipper model. *Mol.Endocrinol.* (1990) 4 : 1294-1301.
- **Forman,B.M.**, Good,E., Chen,J., Oro,A.E., Bradley,D.J., Perlmann,T., Noonan,D.J., Burka,L.T., McMorris,T., Lamph,W.W., Evans,R.M. and C.Weinberger. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites.*Cell* (1995) 81 : 687-693.
- **Forman,B.M.**, J.Chen, B.Blumberg, S.A.Kliwer, R.Henshaw, E.S.Ong and R.M.Evans. Cross-talk among  $ROR\alpha$ 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol.Endocrinol.* (1994) 8 : 1253-1261.
- **Forman,B.M.**, Tontonoz,P., Chen,J., Brun,R.P., Spiegelman,B.M. and R.M.Evans. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor  $PPAR\gamma$ . *Cell* (1995) 83 : 803-812.
- **Forrest,D.**, M.Sjöberg and B.Vennström. Contrasting developmental and tissue-specific expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes. *The EMBO J.* (1990) 9 : 1519-1528.
- **Freedman,L.P.**, B.F.Luisi, Z.Richard Korszun, R.Basavappa, P.B.Sigler and K.R.Yamamoto. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* (1988) 334 : 543-546.

- **Gelman,L.**, B.Staels and J.Auwerx. Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Médecine/Science* (1997) 13 : 961-970.
- **Girasole,G.**, R.L.Jilka, G.Passeri, S.Boswell, G.Boder, D.C.Williams and S.C.Manolagas. 17 $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by Bone Marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro:a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clinical Investigation* (1992) 89 : 883-891.
- **Giguère,V.**, L.D.B.McBroom and G.Flock. Determinants of target gene specificity for ROR $\alpha$ 1 : monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol.Cell.Biol.* (1995) 15 : 2517-2526.
- **Giguère,V.**, M.Tini, G.Flock, E.Ong, R.M.Evans and G.Otulakowski. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR- $\alpha$ , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes and Development* (1994) 8 : 538-553.
- **Giguère,V.**, N.Yang, P.Segui and R.M.Evans. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* (1988) 331 : 91-94.
- **Glass,C.K.** Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Reviews* (1994) 15 : 391-407.
- **Göttlicher,M.**, Widmark,E., Li,Q. and J.A.Gustafsson. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1992) 89 : 4653-4657.
- **Graig,A.M. and D.T.Denhardt.** The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) : promoter structure, activity and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene* (1991) 100 : 163-171.
- **Green,S. and P.Chambon.** The oestrogen receptor : from perception to mechanism. In *Nuclear Hormone Receptors : Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities.* Malcom G.Parker Ed., Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London (1991).
- **Gronemeyer,H. and D.Moras.** How to finger DNA. *Nature* (1995) 375 : 190-191.
- **Gronemeyer,H. and V.Laudet.** Transcription factors 3 : nuclear receptors. *Protein Profile* (1995) 2 : 1173-1213.

- **Guiochon-Mantel,A.**, K.Delabre, P.Lescop and E.Milgrom. Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1994) 91 : 7179-7183.
- **Guiochon-Mantel,A.**, Loosfelt,H., Lescop,P., Sar,S., Atger,M., Perrot-Applanat,M. and E.Milgrom. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor : evidence for interaction between monomers. Cell (1989) 57 : 1147-1154.
- **Guo,X.**, M.A.Harmon, V.Laudet, D.J.Mangelsdorf and M.J.Palmer. Isolation of a functional ecdysteroid receptor homologue from the Ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). Soumis.
- **Hadzic,E.**, V.Desai-Yajnik, E.Helmer, S.Guo, S.Wu, N.Koudinova, J.Casanova, B.M.Raaka, and H.H.Samuels. A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor  $\alpha$  is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. Mol.Cell.Biol. (1995) 15 : 4507-4517.
- **Halachmi,S.**, Marden,E., Martin,G., Mackay,H., Abbondanza,C. and M.Brown. Estrogen receptor-associated proteins : possible mediators of hormone-induced transcription.Science (1994) 264 : 1455-1458.
- **Härd,T.**, E.Kellenbach, R.Boelens, B.A.Maler, K.Dahlman, L.P.Freedman, J.Carlstedt-Duke, K.R.Yamamoto, J.A.Gustafsson and R.Kaptein. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. Science (1990) 249 : 157-160.
- **Harding,H.P. and M.A.Lazar.** The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. Mol.Cell.Biol. (1995) 15 : 4791-4802.
- **Harding,H.P. and M.A.Lazar.** The orphan receptor Rev-ErbA $\alpha$  activates transcription via a novel response element. Mol.Cell.Biol. (1993) 13 : 3113-3121.
- **Hirose,T.**, Smith,R.J. and A.M.Jetten. ROR $\gamma$  : the thrid member of ROR/RZR orphan receptor subfmily that is highly expressed in skeletal muscle. Biochem.Biophys.Res.Comm. (1994) 205 : 1976-1983.
- **Hoch,M.**, N.Gerwin, H.Taubert and H.Jackle. Competition for overlapping sites in the regulatory region of the *Drosophila* gene Kruppel. Science (1992) 256 : 94-97.

- **Holland,P.W.**, J.Garcia-Fernandez, N.A.Williams and A.Sidow. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development* (1994) Supplement : 125-133.
- **Hollenberg,S.M. and R.M.Evans.** Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* (1988) 55 : 899-906.
- **Hörlein,A.J.**, A.M.Näär, T.Heinzel, J.Torchia, B.Gloss, .Kurokawa, A.Ryan, Y.Kamei, M.Söderström, C.K.Glass and M.G.Rosenfeld. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* (1995) 377 : 397-403.
- **Horowitz,M.C.** Cytokines and estrogen in Bone:anti-osteoporotic effects. *Science* (1993) 260 : 626-627.
- **Horwitz,K.B.**, Jackson,T.A., Bain,D.L., Richer,J.K., Takimoto,G.S. and L.Tung. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol.Endocrinol.* (1996) 10 : 1167-1177.
- **Howard,K.J.**, S.J.Holley, K.R.Yamamoto and C.W.Distelhorst. Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* (1990) 265 : 11928-11935.
- **Hurlin,P.J.**, K.P.Foley, D.E.Ayer, R.N.Eisenman, D.Hanahan and J.M.Arbeit. Regulation of myc and mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* (1995) 11 : 2487 -2501. (b)
- **Hurlin,P.J.**, C.Quéva, P.J.Koskinen, E.Steingrimsson, D.E.Ayer, N.G.Copeland, N.A. Jenkins and R.N.Eisenman. Mad3 and Mad4:novel max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *The EMBO J.* (1995) 14 : 5646-5659.(a)
- **Ikeda,Y.**, D.S.Lala, X.Luo, E.Kim, M.P.Moisan and K.L.Parker. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol.Endo.* (1993) 7 : 852-860.
- **Ingham,P.W.** Hedgehog points the way. *Current Biology* (1994) 4 : 347-350.
- **Issemann,I. and S.Green.** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* (1990) 347 : 645-650.

- **Izumo,S. and V.Mahdavi.** Thyroid hormone receptor  $\alpha$  isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* (1988) 334 : 539-542.
- **Jacq,X., C.Brou, Y.Lutz, I.Davidson, P.Chambon and L.Tora.** Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* (1994) 79 : 107-117.
- **Janknecht,R. and T.Hunter.** A growing coactivator network. *Nature* (1996) 383 : 22-23.
- **Jilka,R.L., G.Hangoc, G.Girasole, G.Passerri, D.C.Williams, J.S.Abrams, B.Boyce, H.Broxmeyer, S.C.Manolagas.** Increased osteoclast development after estrogen loss:mediation by interleukin-6. *Science* (1992) 257 : 88-91.
- **Johnston,S.D., X.Liu, F.Zuo, T.L.Eisenbraun, S.R.Wiley, R.J.Kraus and J.E.Mertz.** Estrogen-related receptor  $\alpha$ 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol.Endocrinol.* (1997) 11 : 342-352.
- **Kamei,Y., L.Xu, T.Heinzel, J.Torchia, R.Kurokawa, B.Gloss, S.C.Lin, R.A.Heyman,D.W.Rose, C.K.Glass and M.G.Rosenfeld.** A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* (1996) 85 : 403-414.
- **Kato,S.,H.Endoh,Y.Masuhiro, T.Kitamoto, S.Uchiyama, H.Sasaki, S.Masushige, Y.Gotoh, E.Nishida, H.Kawashima, D.Metzger and P.Chambon.** Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* (1995) 270 : 1491-1494.
- **Keller,H. and W.Wahli.** Steroid hormone and related receptors. In *principles of Medical Biology, Molecular and Cellular Endocrinology.* E.E.Bittar and N.Bittar, eds., JAI Press Inc., Greenwich, USA, in press.
- **Kennedy,T.E., T.Serafini, J.R. de la Torre and M.Tessier-Lavigne.** Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* (1994) 78 : 425-435.
- **Khosla,S. and B.Lawrence Riggs.** Treatment Options for Osteoporosis. *Mayo.Clin. Proc.* (1995) 70 : 978-982.

- **Kliwer,S.A.**, K.Umesono, D.J.Noonan, R.A.Heyman and R.M.Evans. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* (1992) 358 : 771-774.
- **Kliwer,S.A.**, Lenhard,J.M., Willson,T.M., Patel,I., Morris,D.C. and J.M.Lehmann. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\lambda$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell* (1995) 83 : 813-819.
- **Koenig,R.J.**, M.A.Lazar, R.A.Hodin, G.A.Brent, P.Reed Larsen, W.W.Chin and D.D.Moore. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* (1989) 337 : 659-661.
- **Komm,B.S.**, C.M.Terpening, D.J.Benz, K.A.Graeme, A.Gallegos, M.Korc, G.L.Greene, B.W.O'Malley, M.R.Haussler. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* (1988) 241 : 81-83.
- **Korach,K.S.** Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* (1994) 266 : 1524-1527.
- **Krey,G.**, O.Braissant, F.L'Horset, E.Kalkhoven, M.Peroud, M.G.Parker and W.Wahli. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptors ligand assay. *Mol.Endocrinol.* (1997) 11 : 779-791.
- **Krust,A.**, S.Green, P.Argos, V.Kumar, P.Walter, J.M.Bornert and P.Chambon. The chicken oestrogen receptor sequence : homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO J.* (1986) 5 : 891-897.
- **Kuiper,G.G.J.M.**, E.Enmark, M.Pelto-Huikko, S.Nilsson, J.A.Gustafsson. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* (1996) 93 : 5925-5930.
- **Kurokawa,R.**, J.Direnzo, M.Boehm, J.Sugarman, B.Gloss, M.G.Rosenfeld, R.A.Heyman and C.K.Glass. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* (1994) 371 : 528-531.
- **Kurokawa,R.**, Söderström,M., Hörlein,A., Halachmi,S., Brown,M., Rosenfeld,M.G. and C.K.Glass. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* (1995) 377 : 451-453.

- **Lala,D.S.**, P.M.Syka, S.B.Lazarchik, D.J.Mangelsdorf, K.L.Parker and R.A.Heyman. Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1997) 94 : 4895-4900.
- **Laudet,V. and D.Stéhelin.** Nuclear Receptors : flexible friends. *Current Biology* (1992) 2 : 293-295.
- **Laudet,V. and G.Adelmant.** Nuclear receptors : Lonesome orphans. *Current Biology* (1995) 5 : 124-127.
- **Laudet,V.**, A.Bègue, C.Henry-Duthoit, A.Joubel, P.Martin, D.Stéhelin and S.Saule. Genomic organization of the human thyroid hormone receptor  $\alpha$  (c-erba-1) gene. *Nucleic Acids Res.* (1991) 19 : 1105-1112.
- **Laudet,V.**, C.Hänni, J.Coll, F.Catzeflis and D.Stéhelin. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *The EMBO J.* (1992) 11 : 1003-1013.
- **Laudet,V.** Evolution of the nuclear receptor superfamily : early diversification from an ancestral orphan receptor. *Molecular Endocrinology*, in press.
- **Lazar,M.A.**, R.A.Hodin, D.S.Darling and W.W.Chin. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA $\alpha$  transcriptional unit. *Mol.Cell.Biol.* (1989) 9 : 1128-1136.
- **Lazar,M.A.**, R.A.Hodin, G.Cardona and W.Chin. Gene expression form the c-erbA $\alpha$ /Rev-Erb $\alpha$  genomic locus. *J.Biol.Chem.* (1990) 265 : 12859-12863.
- **Le Douarin,B.**, Zechel,C., Garnier,J.M., Lutz,Y., Tora,L., Pierrat,B., Heery,D., Gronemeyer,H., Chambon,P. and R.Losson. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *The EMBO J.* (1995) 14 : 2020-2033.
- **Leblanc,B.P. and H.G.Stunnenberg.** 9-cis retinoic acid signaling : changing pattners causes some excitement. *Genes and Development* (1995) 9 : 1811-1816.
- **Lee,J.W.**, Ryan,F., Swaffield,J.C., Johnston,S.A. and D.D.Moore. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* (1995) 374 : 91-94.

- **Lee, M.S.,** S.A.Kliwer, J.Provencal, P.E.Wright, R.M.Evans. Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$  DNA binding domain : a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* (1993) 260 : 1117-1121.
- **Lehmann, J.M.,** Moore, L.B., Smith-Oliver, A., Wilkison, W.O., T.M. Willson and Kliwer, S.A. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand For Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). *J.Biol.Chem.* (1995) 270 : 12953-12956.
- **Lehmann, J.M.,** S.A.Kliwer, L.B.Moore, A.Smith-Oliver, B.B.Oliver, J.L.Su, S.S.Sundseth, D.A.Winegar, D.E.Blanchard, T.A.Spencer and T.M.Willson. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J.Biol.Chem.* (1997) 272 : 3137-3140.
- **Lemberger, T.,** B.Desvergne, W.Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptors : a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Ann.Rev.Cell.Dev.Biol.* (1996) 12 : 355-363.
- **Levin, A.A.,** L.J.Sturzenbecker, S.Kazmer, T.Bosakowski, C.Huselton, G.Allenby, J.Speck, Cl.Kratzeisen, M.Rosenberger, A.Lovey and J.F.Grippo. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR $\alpha$ . *Nature* (1992) 355 : 359-361.
- **Lin, K.H.,** C.Parkison, P.McPhie and S.Y.Cheng. An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human  $\beta$ 1 thyroid hormone nuclear receptor. *Mol.Endocrinol.* (1991) 5 : 485-492.
- **Liu, D.,** Y.Le Drean, M.Ekker, F.Xiong and C.L.Hew. Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin II $\beta$  subunit gene. *Mol.Endo.* (1997) 11 : 877-890.
- **Lufkin, E.G. and S.J.Ory.** Postmenopausal Estrogen Therapy. *Trends Endocrinol. Metab.* (1995) 6 : 50-54.
- **Luisi, B. and L.Freedman.** Dimer, dimer binding tight. *Nature* (1995) 375 : 359-360.
- **Luisi, B.F.,** W.X Xu, Z.Otwinowski, L.P.Freedman, K.R.Yamamoto and P.B.Sigler. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* (1991) 352 : 497-505.
- **Luo, X.,** Ikeda, Y., Schlosser, D.A. and K.L.Parker. Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene. *Mol.Endocrinol.* (1995) 9 : 1233-1239.

- **Luo, J.**, R.Sladek, J.A.Bader, A.Matthyssen, J.Rossant and V.Giguère. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- $\beta$ . *Nature* (1997) 388 : 778-782.
- **Lynch, J.P.**, D.S.Lala, J.J.Peluso, W.Luo, K.L.Parker and B.A.White. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol.Endo.* (1993) 7 : 776-786.
- **Mader, S.**, J.Y.Chen, Z.Chen, J.White, P.Chambon and H.Gronemeyer. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *The EMBO J.* (1993) 12 : 5029-5041.
- **Mader, S.**, Kumar, V., de Verneuil, H. and P.Chambon. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* (1989) 338 : 371-274.
- **Mangelsdorf, D.J. and R.M.Evans.** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* (1995) 83 : 841-850. (a)
- **Mangelsdorf, D.J.**, C.Thummel, M.Beato, P.Herrlich and G.Schütz. The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell* (1995) 83 : 835-839. (b)
- **Miyajima, N.**, R.Horiuchi, Y.Shibuya, S.I.Fukushige, K.I.Matsubara, K.Toyoshima and T.Yamamoto. Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* (1989) 57 : 31-39.
- **Näär, A.M.**, J.M.Boutin, S.M.Lipkin, V.C.Yu, J.M.Holloway, C.K.Glass and M.G.Rosenfeld. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* (1991) 65 : 1267-1279.
- **Nagy, L.**, H.Y.Kao, D.Chakravarti, R.J.Lin, C.A.Hasig, D.E.Ayer, S.L.Schreiber and R.M.Evans. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* (1997) 89 : 373-380.
- **Nornes, H.O. and M.Carry.** *Brain Res.* (1978) 159 : 1-16.

- **O'Donnell,A.L. and R.J.Koenig.** Mutational analysis identifies a new functional domain of the thyroid hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* (1990) 4 : 715-720.
- **Ogryzko,V.V., R.L.Schiltz, V.Russanova, B.H.Howard and Y.Nakatani.** The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* (1996) 87 : 953-959.
- **Onate,S.A., S.Y.Tsai, M.J.Tsai, B.W.O'Malley.** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* (1995) 270 : 1354-1357.
- **Oro,A.E., E.S.Ong, J.S.Margolis, J.W.Posakony, M.McKeown and R.M.Evans.** The Drosophila gene knirps-related is a member of the steroid-receptor gene. *Nature* (1988) 336 : 493-496.
- **Oursler,M.J., P.Osdoby, J.Pyfferoen, B.L.Riggs and T.C.Spelsberg.** Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1991) 88 : 6613-6617.
- **Parker,M.G.** Structure and function of nuclear hormone receptors. In *Seminars in Cancer Biology* (1990) 1 : 81-87.
- **Pazin,M.J. and J.T.Kadonaga.** What's up and down with histone deacetylation and transcription ? *Cell* (1997) 89 : 325-328.
- **Perlmann,T. and L.Jansson.** A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes and Develop.* (1995) 9 : 769-782.
- **Perlmann,T. and R.M.Evans.** Nuclear receptors in sicily : all in the famiglia. *Cell* (1997) 90 : 391-397.
- **Pettersson,K., K.Svensson, R.Mattsson, B.Carlsson, R.Ohlsson and A.Berkenstam.** Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* (1996) 54 : 211-223.
- **Picard,D. and K.R.Yamamoto.** Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO J.* (1987) 6 : 3333-3340.

- **Predki,P.F.**, D.Zamble, B.Sarkar and V.Giguère. Ordered Binding of Retinoic Acid and Retinoid-X Receptors to Asymmetric Response Element Involves Determinants Adjacent to the DNA-Binding Domain. *Mol Endocrinol.* (1994) 8 : 31-39.
- **Rastinejad,F.**, T.Perlmann , R.M.Evans and P.B.Sigler. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* (1995) 375 : 203-211.
- **Renaud,J.P.**, N.Rochel, M.Ruff, V.Vivat, P.Chambon, H.Gronemeyer and D.Moras. Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* (1995) 378 : 681-689.
- **Retnakaran,R.**, G.Flock and V.Giguère. Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol.Endocrinol.* (1994) 8 : 1234-1244.
- **Rodriguez,J.C.**, Gil-Gomez,G., Hegardt,G. and D.Haro. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J.Biol.Chem.* (1994) 269 : 18767-18772.
- **Rothe,M.**, U.Nauber and H.Jäckle. Three hormone receptor-like Drosophila genes encode an identical DNA-binding finger. *The EMBO J.* (1989) 8 : 3087-3094.
- **Rudnicki,M.A.,P.N.J.** Schnegelsberg, R.H.Stead, T.Braun, H.H.Arnold and R.Jaenisch. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* (1993) 75 : 1351-1359.
- **Saez,J.M. and P.Durand.** Rôle du facteur SF1 dans le développement des gonades et des surrénales et dans la stéroïdogénèse. *Médecine/Sciences* (1994) 10 : 1315-1317.
- **Sasaki,H. and B.L.Hogan.** HNF-3 $\beta$  as a regulator of floor plate development. *Cell* (1994) 76 : 103-115.
- **Schaeren-Wiemers,N.**, E.André, J.Kapfhammer, M.Becker-André. The expression pattern of the orphan nuclear receptor RZR $\beta$  in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *The Eur.J. of Neuroscience* (in press).

- **Schulman, I.R.**, C.Li, J.W.R.Schwabe and R.M.Evans. The phantom ligand effect : allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes and Dev.* (1997) 11 : 299-308.
- **Schwabe, J.W.R.**, Chapman, L., Finch, J.T. and D.Rhodes. The crystal structure of the Estrogen Receptor DNA-binding domain bound to DNA : how receptors discriminate between their response elements. *Cell* (1993) 75 : 567-578.
- **Segraves, W.A. and D.S.Hogness.** The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes and Development* (1990) 4 : 204-219.
- **Segraves, W.A.** Something old, some things new : the steroid receptor superfamily in *Drosophila*. *Cell* (1991) 67 : 225-228.
- **Sengupta, P.**, H.A.Colbert and C.I.Bargmann. The *C.elegans* gene *odr-7* encodes an olfactory-specific member of the nuclear receptor superfamily. *Cell* (1994) 79 : 971-980.
- **Seol, W.**, H.S.Choi and D.D.Moore. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* (1996) 272 : 1336-1338.
- **Serafini, T.**, T.E.Kennedy, M.J.Galko, C.Mirzayan, T.M.Jesell and M.Tessier-Lavigne. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C.elegans* UNC-6. *Cell* (1994) 78 : 409-424.
- **Shen, W.H.**, C.C.D.Moore, Y.Ikeda, K.L.Parker and H.A.Ingraham. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene : a link to the sex determination cascade. *Cell* (1994) 77 : 651-661.
- **Shyamala, G.** Roles of estrogen and progesterone in normal mammary gland development. Insights from progesterone receptor null mutant mice and in situ localization of receptor. *TEM* (1997) 8 : 34-39.
- **Sladek, R.**, J.A.Bader and V.Giguère. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor  $\alpha$  is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol.Cell.Biol.* (1997) 17 : 5400-5409.

- **Smith, J.C.** Dorso-ventral patterning in the neural tube. *Curent Biology* (1993) 3 : 582-585.
- **Sommer, B., M.Bickel, W.Hofstetter and A.Wetterwald.** Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* (1996) 19 : 371-380.
- **Spencer, T.E., G.Jenster, M.M.Burcin, C.David Allis, J.Zhou, C.A.Mizzen, N.J.McKenna, S.A.Onate, S.Y.Tsai, M.J.Tsai and B.W.O'Malley.** Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* (1997) 389 : 194-198.
- **Tessier-Lavigne, M., M.Placzek, A.G.S.Lumsden, J.Dodd and T.M.Jessell.** Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* (1988) 336 : 775-778.
- **Tora, L., J.White, C.Brou, D.Tasset, N.Webster, E.Scheer and P.Chambon.** The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* (1989) 59 : 477-487.
- **Turner, R.T., B.L.Riggs and T.C.Spelsberg.** Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews* (1994) 15 : 275-300.
- **Umesono, K. and R.M.Evans.** Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* (1989) 57 : 1139-1146.
- **Umesono, K., K.K.Murakami, C.C.Thompson and R.M.Evans.** Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* (1991) 65 : 1255-1266.
- **Vallee, B.L., J.E.Coleman and D.S.Auld.** Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1991) 88 : 999-1003.
- **Vernejoul, M.C., P.Marie.** Cellules osseuses et remodelage osseux. *médecine/sciences* (1993) 9 : 1192-1203.
- **Voegel, J.J., M.J.S.Heine, C.Zechel, P.Chambon and H.Gronemeyer.** TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *The EMBO J.* (1996) 15 : 3667-3675.
- **Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L. Baxter, J.D. and R.J.Fletterick.** A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* (1995) 378 : 690-697.

- **Weis,K.E.**, K.Ekena, J.A.Thomas, G.Lazennec and B.S.Katzenellenbogen. Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol Endocrinol* (1996) 10 : 1388-1398.
- **White,R.**, M.Sjöberg, E.Kalkhoven and M.G.Parker.Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *The EMBO J.* (1997) 16 : 1427-1435.
- **Wiley,S.R.**, R.J.Kraus, F.Zuo, E.E.Murray, K.Loritz and J.E.Mertz. SV40 early-to-late switch involves titration of cellular transcriptional repressors. *Genes & Development* (1993) 7:2206-2219.
- **Wilson,T.E.**, Paulsen,R.E., Padgett,K.A. and J.Milbrandt. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* (1992) 256 : 107-110.
- **Wilson,T.E.**, T.J.Fahrner and J.Milbrandt. The orphan receptors NGFI-B steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol.Cell.Biol.* (1993) 13 : 5794-5804.
- **Wurtz,J.M.**, W.Bourguet, J.P.Renaud, V.Vivat, P.Chambon, D.Moras and H.Gronemeyer. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct.Biol.* (1996) 3 : 87-94.
- **Yamada,T.**, S.L.Pfaff, T.Edlund and T.M.Jessell. Control of cell pattern in the neural tube : motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* (1993) 73 : 673-686.
- **Yang,N.N.**, H.U.Bryant, S.Hardikar, M.Sato, R.J.S.Galvin, A.L.Glasebrook and J.D.Terme. Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor- $\beta$ 3 gene expression in rat Bone:a potential mechanism for estrogen-or raloxifene-mediated Bone maintenance. *ENDO* (1996) 137 : 2075-2084.
- **Yang,N.**, H.Shigeta, H.Shi and C.T.Teng. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J.Biol.Chem.* (1996) 271 : 5795-5804.
- **Zahraoui,A. and G.Cuny.** Nucleotide sequence of the chicken proto-oncogene c-erbA corresponding to domain 1 of v-erbA. *Eur.J.Biochem.* (1987) 166 : 63-69.

- **Zamir,I.**, H.P.Harding,G.B.Atkins, A.Hörlein, C.K.Glass, M.G.Rosenfeld and M.A.Lazar. A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol.Cell.Biol.* (1996) 16 : 5458-5465.
- **Zamir,I.**, J.Zhang and M.A.Lazar. Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes and Development* (1997) 11 835-846.
- **Zanaria,E.**, F.Muscatelli, B.Bardoni, T.M.Strom, S.Guioli, W.Guo, E.Lalli, C.Moser, A.P.Walker, E.R.McCabe, T. Meitinger, A.P.Monaco, P.Sassone-Corsi, G.Camerino. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* (1994) 372 : 635-641.
- **Zardoya,R.**, E.Abouheif and A.Meyer. Evolutionary analyses of hedghog and Hoxd-10 genes in fish species closely related to the zebrasifsh. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1996) 93 : 13036-13041.
- **Zechel,C.**, Shen,X.Q., Chambon,P. and H.Gronemeyer. Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of XR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *The EMBO J.* (1994) 13 : 1414-1424. (a)
- **Zechel,C.**, X.Q.Shen, J.Y.Chen, Z.P.Chen, P.Chambon and H.Gronemeyer. The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the bindng specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *The EMBO J.* (1994) 13 : 1425-1433. (b)
- **Zenke,M.**, A.Munoz, J.Sap, B.Vennström and H.Beug. v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. *Cell* (1990) 61 : 1035-1049.
- **Zilliacus,J.**, A.P.H.Wright, J.Carlstedt-Duke and J.A.Gustafsson. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol.Endocrinol.* (1995) 9 : 389-400.

