

B00 2 202 667

So 376
1998
497

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

N° d'ordre 2338

THESE

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

par

Sandrine MAILFAIT



**LE RECEPTEUR α DE L'ACIDE RETINOIQUE :
RESIDUS DETERMINANTS DU SITE DE LIAISON
ET ROLE DANS LE MECANISME D'ACTIVATION**

Soutenue le 23 Septembre 1998 devant la Commission d'Examen :

Président : Professeur G. SPICK
Rapporteurs : Docteur E. THOREAU
Docteur J.L. BORGNA
Examineurs : Professeur P. FORMSTECHE
Professeur B. SABLONNIERE



À ma mère.

*"On fait de la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres;
mais une accumulation de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison."*

Poincaré



*"Quand le destin veut que tu sois enclume, prend patience.
Et lorsque tu es marteau, alors frappe."*

Proverbe Arabe

Je voudrais remercier le Professeur Geneviève Spick d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie le Docteur Etienne Thoreau et le Docteur Jean-Louis Borgna d'avoir accepté de juger mon travail. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Pierre Formstecher de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour ses grandes compétences scientifiques mises à profit dans l'aboutissement de nos travaux. Je vous suis reconnaissante de m'avoir consacré des heures qui vous sont précieuses dans votre emploi du temps si chargé et d'avoir "redonné vie" à notre récepteur et à ses résidus de tyrosine par la modélisation moléculaire. La nitration de nos résidus nous a bien donné du souci mais "la recherche, c'est cultiver le doute!".

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Bernard Sablonnière. Je vous remercie de m'avoir initiée à la recherche au cours de ces trois années de thèse. Vous m'avez permis d'acquérir une certaine autonomie de travail et donné la force faire face aux nombreuses difficultés que nous avons rencontrées.

Un grand merci au Docteur Denise Belaïche pour son aide et son soutien. Enfin, après des série de charbons, encore des charbons et toujours des charbons, nous sommes arrivées au bout de nos peines. La persévérance nous a fait triompher. Je comprends que tu apprécies tes séjours au Sénégal, car là-bas au moins, bien que les gens en aient la couleur, le charbon ne fait pas partie du quotidien.

Je voudrais également dire merci à Françoise Delporte pour son aide et son écoute lorsque mon moral n'était pas à son point culminant. Et cette fois-ci, c'est terminé ! Il n'y aura plus de corvée de préparation de charbons ou de cellules à reprendre.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Gilbert Briand et au Docteur Mostapha Kouach du Service de Spectrométrie de Masse pour leur patience avec nos travaux de spectrométrie de masse et pour leur gentillesse et leur sympathie. Il est toujours agréable de bavarder avec nos voisins.

Je remercie aussi tous ceux qui auraient pu ou qui ont pu m'aider d'une façon ou d'une autre.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Bernard Sablonnière à l'Unité INSERM 459 dirigée par le Professeur Pierre Formstecher. Il a donné lieu à deux communications par affiche et à une publication soumise.

Mailfait S., Belaïche D., Dallery N., Sablonnière B. et Formstecher P.

Mécanismes moléculaires de l'interaction RARs-ligands : implication de résidus de lysines, d'arginines et de tyrosines

XXIII^e Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Poitiers, du 2 au 5 Juillet 1996.

Mailfait S., Belaïche D., Kouach M., Sablonnière B. et Formstecher P.

Mécanisme d'interaction RAR α -ligand : mise en évidence d'une tyrosine essentielle par spectrométrie de masse et par mutagenèse dirigée

14^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse. Lille, du 15 au 18 Septembre 1997.

Mailfait S., Belaïche D., Kouach M., Dallery N., Formstecher P. and Sablonnière B

Critical role of tyrosine 277 in the ligand-binding and transactivating properties of retinoic acid receptor α

Manuscrit soumis à "Journal of Biological Chemistry".

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	10
RESUME	11
REVUE GENERALE	12
Chapitre I : <i>Les rétinoïdes</i>	13
I. Définition et historique des rétinoïdes	14
II. Vitamine A (rétinol) et rétinoïdes naturels	14
1. Biosynthèse de l'acide rétinoïque et son métabolisme	16
1.1. Transport extracellulaire du rétinol	16
1.2. Transport intracellulaire et métabolisme de l'acide rétinoïque	17
2. Activités biologiques des rétinoïdes	19
2.1. Développement	20
2.2. Prolifération - Différenciation cellulaire - Apoptose	21
2.3. Thérapeutique	22
2.3.1. Thérapeutique des hémopathies malignes	22
2.3.2. Therapie cancéreuse et chimioprévention	22
2.3.3. Dermatologie : acné et psoriasis	25
III. Rétinoïdes de synthèse	25
1. Définition	25
2. Evolution structurale des rétinoïdes	27
3. Spécificité des ligands	28
3.1. Ligands spécifiques des RARs	29
3.1.1. Ligands sélectifs de RAR α	29
3.1.2. Ligands sélectifs de RAR β	32
3.1.3. Ligands sélectifs de RAR γ	33
3.1.4. Antagonistes et agonistes inverses des RARs	36
3.2. Ligands spécifiques des RXRs	41

3.2.1. Rétinoïdes agonistes des RXRs	42
3.2.2. Rétinoïdes antagonistes des RXRs	43
3.3. Ligands panagonistes des RARs et des RXRs	45
3.4. Rétinoïdes à activité anti AP-1	45
4. Applications thérapeutiques des rétinoides de synthèse	46
4.1. Sélectivité des rétinoides et tératogénicité	46
4.2. Sélectivité des rétinoides et utilisation thérapeutique	49
Chapitre II : Mécanismes de la signalisation induite par les rétinoides	53
I. Les récepteurs nucléaires	54
1. Généralités	54
2. Aspect historique	54
3. Organisation générale des récepteurs nucléaires	55
4. Evolution de la superfamille des récepteurs nucléaires	55
II. Les récepteurs de l'acide rétinoidique	58
1. Découverte des récepteurs de l'acide rétinoidique	58
2. Les RARs et les RXRs	60
2.1. Les RARs : structure, isoformes, distribution tissulaire	60
2.2. Les RXRs : structure, isoformes, distribution tissulaire	64
III. Le domaine de liaison au ligand	65
1. Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand de hRXR α	66
2. Le domaine E des RARs en présence du ligand	68
2.1. Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand de hRAR γ	68
2.2. Acides aminés du domaine E essentiels à la liaison au ligand	73
2.2.1. Positionnement de <i>t</i> -RA dans le site de liaison selon la cristallographie	73
2.2.2. Positionnement de 9 <i>c</i> -RA dans le site de liaison selon la cristallographie	73
2.2.3. Les résidus d'acides aminés de la LBP	75
2.2.3.1. Mutations altérant la liaison de <i>t</i> -RA	75
2.2.3.2. Les résidus impliqués dans la sélectivité des RARs	76

2.2.3.2.1.	Construction de récepteurs chimères	76
2.2.3.2.2.	Les données de la cristallographie	77
2.2.4.	Les résidus d'acides aminés extérieurs à la LBP	80
2.2.4.1.	Les résidus jouant un rôle spécifique en présence d'un ligand agoniste	80
2.2.4.2.	Les résidus C-terminaux du domaine E	81
2.2.5.	Comparaison des données obtenues par mutagenèse dirigée avec les résidus de la poche de liaison de hRAR γ en présence de <i>t</i> -RA	82
3.	Apport de la cristallographie dans l'étude de la structure des ligands fixés dans la poche de liaison	82
4.	L'action des antagonistes sur le mécanisme d'activation des RARs	86
5.	La spécificité de liaison du domaine E de RXR	90
IV.	La transactivation	90
1.	La liaison à l'ADN	91
1.1.	Le domaine de liaison à l'ADN	91
1.2.	Les éléments de réponse	95
1.2.1.	Classification des récepteurs selon leur liaison à l'ADN	95
1.2.2.	Polymorphisme des HREs	96
2.	L'hétérodimérisation avec RXR	96
2.1.	La règle 1-2-3-4-5	97
2.2.	Les hétérodimères RAR/RXR	97
3.	Le rôle du ligand dans l'activité transcriptionnelle	100
3.1.	La fixation du ligand dans l'hétérodimère RAR/RXR	100
3.2.	Régulation du mécanisme d'hétérodimérisation de RXR	102
3.3.	Les régions de l'activation transcriptionnelle	102
3.4.	Régulation de la transcription par l'intermédiaire des résidus de la boîte L	104
4.	Mécanisme moléculaire de la transcription	104
4.1.	Les cofacteurs	105
4.1.1.	Les coactivateurs	105
4.1.1.	Les corépresseurs	108
4.2.	La phosphorylation des récepteurs nucléaires	109

RESULTATS ET DISCUSSION	110
I. Identification d'un résidu de tyrosine du domaine E de RAR α critique pour la liaison aux ligands et la fonction de transactivation	112
1. Inactivation du site de liaison par des réactifs spécifiques d'acides aminés	112
1.1. Stratégie utilisée	112
1.2. Résultats des expériences d'inactivation	114
2. Protection différentielle par les ligands des RARs	114
2.1. Principe de la protection différentielle	114
2.2. Protection observée selon les ligands et les réactifs	116
3. Expériences de protéolyse limitée	116
4. Etude des résidus de tyrosine du domaine de liaison au ligand de RAR α	118
4.1. Résumé de nos travaux soumis à publication	120
4.2. Publication	121
4.3. Discussion	153
4.3.1. Le TMN agit-il exclusivement sur les résidus de tyrosine ?	153
4.3.2. Utilisation de la spectrométrie de masse	153
4.3.2.1. Principe du spectromètre de masse en mode électrospray	153
4.3.2.2. L'approche par la spectrométrie de masse	154
4.3.2.3. Spectres obtenus	154
4.3.3. Mutation des résidus de tyrosine du LBD de RAR α	155
4.3.3.1. Technique de mesure de l'affinité de liaison	155
4.3.3.2. Analyse de l'activité des mutants	159
4.3.4. Utilisation du modèle moléculaire du LBD-hRAR γ	160
4.3.4.1. Position des résidus de tyrosine dans le LBD de hRAR γ et l'accessibilité au solvant	160
4.3.4.2. Comparaison avec le modèle de RXR α	161
4.3.4.3. La cystéine 267 de RAR β et la tyrosine 277 de RAR α	164
4.3.4.4. Etude des deux résidus de cystéine de Wolfgang C.L. et <i>al.</i>	164
4.3.5. Mutation du résidu de tyrosine 277 par une phénylalanine	168

II. Etude du rôle des résidus : Gly 301, Phe 302, Gly 303 et Leu 266 dans l'interaction RAR α -ligand	169
1. Le choix des résidus d'acides aminés mutés	169
2. Résultats	172
2.1. Affinité de liaison des récepteurs mutés pour différents ligands	172
2.2. Activité transactivatrice des mutants	172
3. Discussion	174
3.1. Rôle des résidus au niveau de la boucle H6-H7	174
3.2. Effet de la mutation L266A	176
3.2.1. La liaison avec les ligands agonistes	176
3.2.2. Implication du résidu de leucine 266 dans le mécanisme antagoniste ?	176
3.3. Position de ces résidus dans le modèle LBD-hRAR γ	177
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	179
APPENDICE TECHNIQUE	182
BIBLIOGRAPHIE	196
LISTE DES ILLUSTRATIONS	220

ABBREVIATIONS

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
APL	: Leucémie à Promyélocytes Aiguë
AR	: Récepteur des Androgènes
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adénosine TriPhosphate
COUP	: Chicken Upsteam Ovalbumin Promotor transcription factor
CRABP:	: Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP	: Cellular Retinol Binding Protein
DBD	: Domaine de Liaison à l'ADN
DMSO	: DiMéthyl SulfOxyde
dNTP	: désoxyNucléotide TriPhosphate
DTNB	: Acide DiThiobis(NitroBenzoïque)
DTT	: DiThioThréitol
EDTA	: EthylDiamine TétrAcétate
ER	: Récepteur des oestrogènes
GR	: Récepteur des Glucocorticoïdes
HNF-4	: Hepatocyte Nuclear Factor 4
HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance
HRE	: Hormone Responsive Element
IPTG	: IsoPropyl Thioβ-Galactoside
LBD	: Domaine de Liaison au Ligand
LBP	: Poche de Liaison au Ligand
LRAT	: Lécithine : Rétinol Acyl Transférase
MMTS	: MéthylMéthaneThioSulfonate
MR	: Récepteur des Minéralocorticoïdes
NAD	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ONPG	: O-NitroPhényl β-Galactoside
PCR	: Polymérase Chain Reaction
PEI	: PolyEthylène Imine
PG	: PhénylGlyoxal
PLP	: Pyridoxal 5' Phosphate
PML	: Protéine Promyélocytaire Leucémique
PPAR	: Peroxisomal Proliferator Activated Receptor
RaldH	: Rétinal Déshydrogénase
RAR	: Retinoic Acid Receptor
RARE	: Retinoic Acid Responsive Element
RBP	: Retinol Binding Protein
REH	: Rétinyl Ester Hydrolase
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RoDH	: Rétinol Déshydrogénase
Rol	: Rétinol
RXR	: Retinoid X Receptor
RXRE:	: Retinoid X Responsive Element
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
SM	: Spectrométrie de Masse
TNM	: TétraNitroMéthane
TR	: Récepteur des hormones Thyroïdiennes
t-RA	: Acide <i>tout-trans</i> Rétinoïque
TTR	: TransThyrétine
VDR	: Récepteur de la Vitamine D
ZPA	: Zone à Activité Polarisatrice

RESUME

L'acide *tout trans* rétinoïque est le principal dérivé actif de la vitamine A. Il présente des activités pléiotropiques comme l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'induction de la différenciation cellulaire ou la régulation de l'apoptose. Compte tenu de ses propriétés, l'acide rétinoïque est utilisé dans le traitement de certaines affections cutanées et de certains cancers tant dans le domaine de la chimiothérapie que de la chimioprévention. Ceci explique les efforts considérables dans la recherche de nouvelles molécules à activité rétinoïde. L'activité des rétinoïdes est contrôlée par des récepteurs nucléaires, RARs et RXRs (α , β et γ), qui régulent l'activation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques. Le développement de nouveaux rétinoïdes a permis d'aboutir à la synthèse d'agonistes et d'antagonistes spécifiques et sélectifs des différentes classes de RARs et des RXRs avec des applications thérapeutiques mieux définies. Pour comprendre les mécanismes d'interaction récepteur-ligand, il est nécessaire de connaître la structure et la conformation du site de liaison au ligand des récepteurs nucléaires. La cristallographie de l'holo-LBD-hRAR γ a permis de mettre en évidence les acides aminés de la poche de liaison de l'acide rétinoïque.

Nous avons principalement ciblé notre étude sur les trois résidus de tyrosine du domaine de liaison au ligand de RAR α et notamment sur le rôle déterminant de la tyrosine 277. Par une approche biochimique indirecte utilisant un réactif spécifique des résidus de tyrosine, le tétranitrométhane, nous avons noté une inactivation dose dépendante de la liaison RAR α -[3 H]t-RA. Grâce au couplage HPLC-Spectrométrie de masse en mode électrospray, nous avons observé une protection par l'acide *tout trans* rétinoïque contre la nitration de la tyrosine 277. La mutation de ce résidu de tyrosine 277 par une alanine engendre une diminution de l'affinité de liaison de l'acide *tout trans* rétinoïque et de plusieurs ligands synthétiques agonistes et réduit considérablement l'activité transactivatrice du récepteur. Cette tyrosine 277 est donc importante dans l'interaction RAR α -ligand bien qu'elle ne semble pas orientée par comparaison au modèle moléculaire du LBD-hRAR γ , vers la poche de liaison au ligand. D'autres résidus d'acides aminés de la poche de liaison au ligand de RAR α ont également été étudiés. Les mutants obtenus ont des affinités de liaison et des activités de transactivation différentielles selon le ligand utilisé. Ces acides aminés semblent donc impliqués dans le mécanisme d'activation agoniste et antagoniste de RAR α .

Revue
générale

Chap. I :

Les rétinoïdes

I. Définition et historique des rétinoïdes

Rétinoïde est un terme générique incluant les molécules naturelles et les composés synthétiques possédant une activité biologique spécifique semblable à la vitamine A encore appelée rétinol. L'intérêt pour les rétinoïdes a commencé au début du XX^{ème} siècle dès l'élaboration du rôle nutritionnel de la vitamine A. La vitamine A est un agent de croissance favorisant la multiplication cellulaire, un agent de régénération tissulaire, un protecteur des épidermes, exerçant une action anti-infectieuse. Elle permet surtout la régénération du pourpre rétinien ou rhodopsine, à l'obscurité. Ces dix dernières années, les recherches se sont concentrées sur les effets du rétinol au niveau des tissus épithéliaux. En effet, une avitaminose A entraîne non seulement une xérophtalmie mais également une hyperkératose de la peau et des altérations de la différenciation normale des épithélia. Ces altérations sont observées dans différentes maladies de la peau et certaines peuvent évoluer vers une tumeur maligne. De ce fait, la détermination du rôle de la vitamine A et des rétinoïdes devint intéressante aussi bien pour les dermatologues que pour les oncologues. Néanmoins, les traitements dermatologiques et anticancéreux avec le rétinol n'ont pas donné les résultats escomptés car les doses nécessaires en vitamine A étaient beaucoup trop élevées et s'accompagnaient d'un syndrome d'hypervitaminose A mal toléré par les patients. Désormais, de nombreux rétinoïdes ont été testés expérimentalement et cliniquement dans l'espoir de découvrir des rétinoïdes plus efficaces avec le moins possible d'effets secondaires. Des métabolites physiologiques de la vitamine A tels que l'acide *trans* rétinoïque et l'acide *9-cis* rétinoïque, aussi bien que des centaines de rétinoïdes synthétiques analogues ont été testés dans différents programmes de recherche expérimentaux. Quelques rétinoïdes sélectifs ont été utilisés dans des essais cliniques (Bollag W., 1996).

II. Vitamine A (rétinol) et rétinoïdes naturels

La vitamine A et ses deux dérivés métaboliques, le rétinaldéhyde et l'acide rétinoïque sont des isoprénoïdes insaturés essentiels à l'homme (fig 1). Par un processus réversible, la vitamine A est oxydée *in vivo* en rétinaldéhyde jouant un rôle important dans la vision. Le taux plasmatique normal en vitamine A chez l'homme est de 0,35 à 0,75 mg/l. L'acide rétinoïque est le principal dérivé de la vitamine A, il peut remplacer l'action du rétinol en cas d'avitaminose pour la croissance et la différenciation épithéliale. Contrairement aux esters de rétinol qui sont stockés dans le foie, l'acide rétinoïque n'est pas conservé mais rapidement

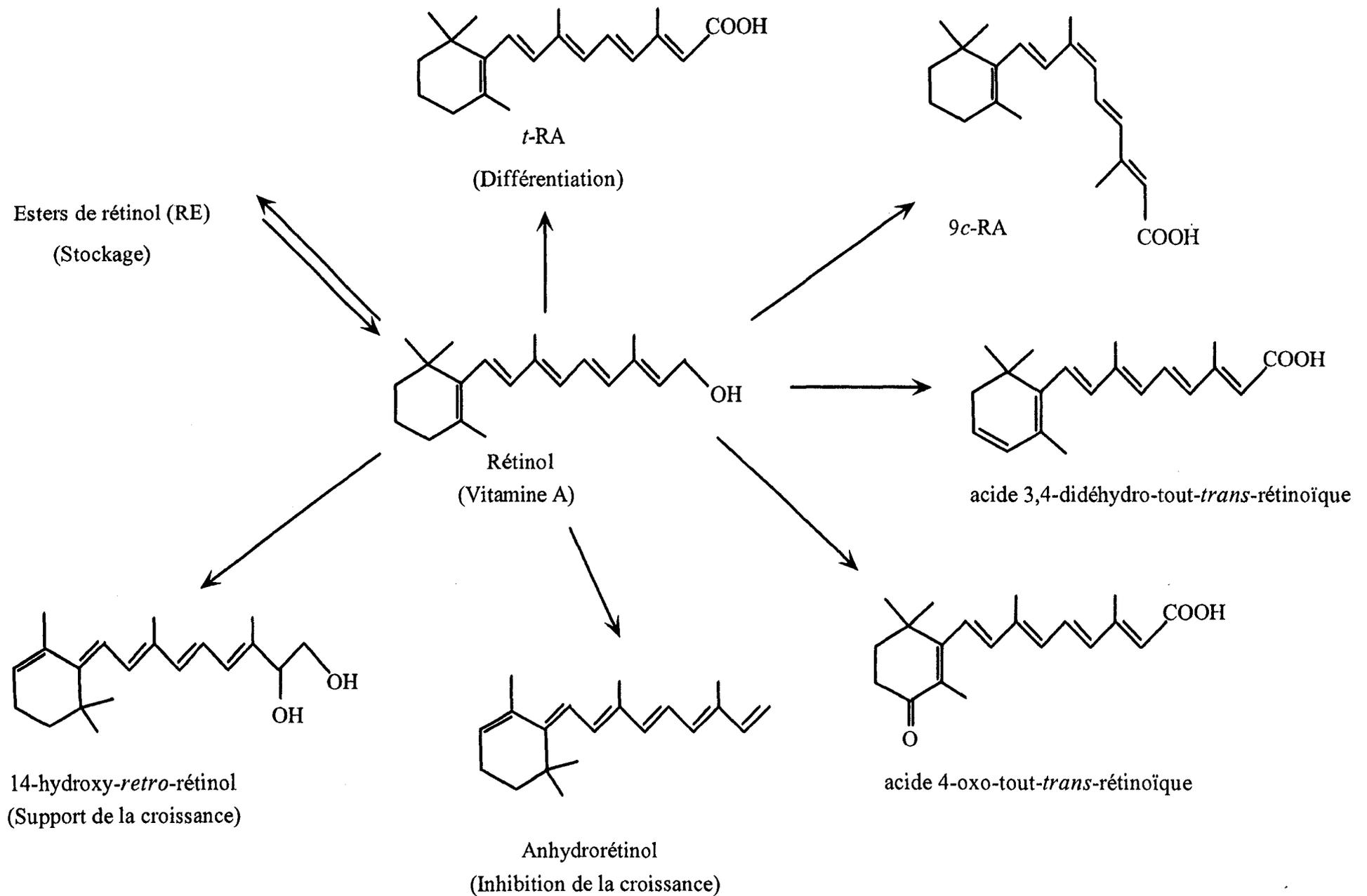


Fig. 1 : Structure des rétinoïdes naturels (Means A.L. et Gudas L.J., 1995)

excrété. Le taux normal dans le plasma humain d'acide *tout trans* rétinol est de 0,55 à 1,20 µg/l et de 0,80 à 2,40 µg/l pour l'acide *13-cis* rétinol (Orfanos C.E. et al., 1997).

1. Biosynthèse de l'acide rétinol et son métabolisme

Les sources alimentaires de la vitamine A sont la provitamine A végétale (β -carotène) et les esters de rétinol d'origine animale (Olson J.A. 1989; Blomhoff R et al., 1992). Le β -carotène est converti en rétinol dans les entérocytes avant d'être stocké dans le foie sous la forme d'esters de rétinol. Le rétinol est en majeure partie transformé en acide rétinol avant de se lier aux récepteurs nucléaires. Comme les rétinoïdes seuls sont insolubles et instables, ils sont solubilisés, protégés et transportés par des protéines spécifiques qui maintiennent la régulation homéostatique des rétinoïdes indépendamment des réserves alimentaires. Ainsi le mécanisme contrôlant le niveau intracellulaire de l'acide rétinol est unique et consiste en une série de systèmes de transport impliquant des protéines de transport extracellulaires (Goodman D.S., 1984, Soprano D.R. et al., 1994), des récepteurs de la membrane plasmique (Bavik C.O. et al., 1992 ; Molaba L. et al., 1993), des protéines de transport intracellulaires (Ong D.E. et al., 1994) et finalement les récepteurs nucléaires des rétinoïdes.

1.1. Transport extracellulaire du rétinol

La protéine de transport physiologique du *tout trans* rétinol chez les vertébrés est la sRBP (serum retinol binding protein) synthétisée dans les hépatocytes. Le rétinol (Rol) est sécrété par le foie sous la forme du complexe Rol-RBP. Ce complexe circule dans le plasma en association avec une autre protéine, la transthyréline (TTR préalablement appelée préalbumine). La RBP est formée d'une simple chaîne polypeptidique de 21 kDa contenant un seul site de liaison pour une seule molécule de rétinol. La formation du complexe Rol-RBP-TTR empêcherait le rétinol associé à la RBP d'être filtré par les glomérules et catabolisé au niveau du rein. Après distribution du rétinol au niveau des cellules cibles, la RBP libre (apoRBP) perd son affinité pour la TTR, puis est éliminée de la circulation sanguine par le rein (Goodman D.S., 1984, Soprano D.R. et al., 1994, Siegenthaler G., 1996). La majeure partie du rétinol qui reste dans le plasma peut ainsi être recyclée environ 10 fois avant d'être irréversiblement utilisée.

1.2. Transport intracellulaire et métabolisme de l'acide rétinoïque

Dans la plupart des tissus, le rétinol non estérifié s'associe à une protéine, la CRBP (Cellular Retinol Binding Protein) (Boerman M.H.E. et Napoli J.L., 1996). Ainsi l'holoCRBP constitue le substrat le plus abondant pour la biosynthèse de l'acide rétinoïque. A ce niveau, le complexe RoI-CRBP est soit reconnu par la LRAT (Lécithine : Rétinol-AcylTransférase) pour l'estérification du rétinol en ester de rétinol, soit il subit la première étape de la biosynthèse, c'est-à-dire l'oxydation du rétinol en rétinal. Plusieurs enzymes sont impliquées dans le métabolisme du rétinol (Duester G., 1966) (fig 2). La principale est la rétinol déshydrogénase (RoDH) microsomale (ou SDR) qui possède une forte affinité pour l'holoCRBP (Napoli J.L. et *al.*, 1995). Cette enzyme de 25 à 35 kDa est exprimée dans le foie et les tissus extrahépatiques et elle catalyse une réaction réversible grâce au cofacteur NADP. Néanmoins, il existe une autre voie de synthèse du rétinal grâce à la RoDH cytosolique (ou ADH I) dont le substrat est l'holoCRBP (Boerman M.H.E. et *al.*, 1996). L'ADH I du foie catalyse l'oxydation du rétinol en rétinal en présence de NAD (réaction réversible). C'est une enzyme cytosolique, dimérique, zinc-dépendante, de 40kDa. Elle est inhibée en présence d'apoCRBP, la synthèse étant alors favorisée par l'intermédiaire de la RoDH microsomale. L'apoCRBP inhibe également l'action de la LRAT mais stimule l'activité de la REH (Rétinyl Ester Hydrolase). Ensuite le complexe CRBP-rétinal est catabolisé de façon irréversible en acide rétinoïque par l'intermédiaire de la RdDH cytosolique (RétinalDéshydrogénase), dont au moins 4 formes majoritaires ont été identifiées et qui est NAD ou NADP-dépendante. En parallèle, il existe un second mécanisme d'oxydation irréversible du rétinal en acide rétinoïque impliquant quelques membres de la famille des cytochromes P 450 (White J.A. et *al.*, 1997, Abu-Abed S.S. et *al.*, 1998). P 450 1 A1, la forme la plus active et P 450 1 A2 sont capables d'oxyder les isomères *tout trans* ou *9-cis* rétinal en isomères d'acide rétinoïque correspondants. Il est également intéressant de noter qu'il existe une CRBP II (56 % d'acides aminés identiques avec la structure primaire de CRBP I) qui se localise exclusivement dans l'intestin chez l'adulte et qui lie le rétinol et le rétinal avec une affinité équivalente à la CRBP I. Son rôle serait de diminuer le taux de conversion du rétinal en acide rétinoïque et d'être par conséquent un substrat pour la LRAT et la réductase microsomale. Cette protéine interviendrait dans le contrôle de la production d'acide rétinoïque après absorption du β -carotène et donc au niveau de son métabolisme.

L'acide rétinoïque agit par l'intermédiaire de deux familles de récepteurs nucléaires, les RARs et les RXRs, qui jouent le rôle de facteurs de transcription ligand-dépendants.

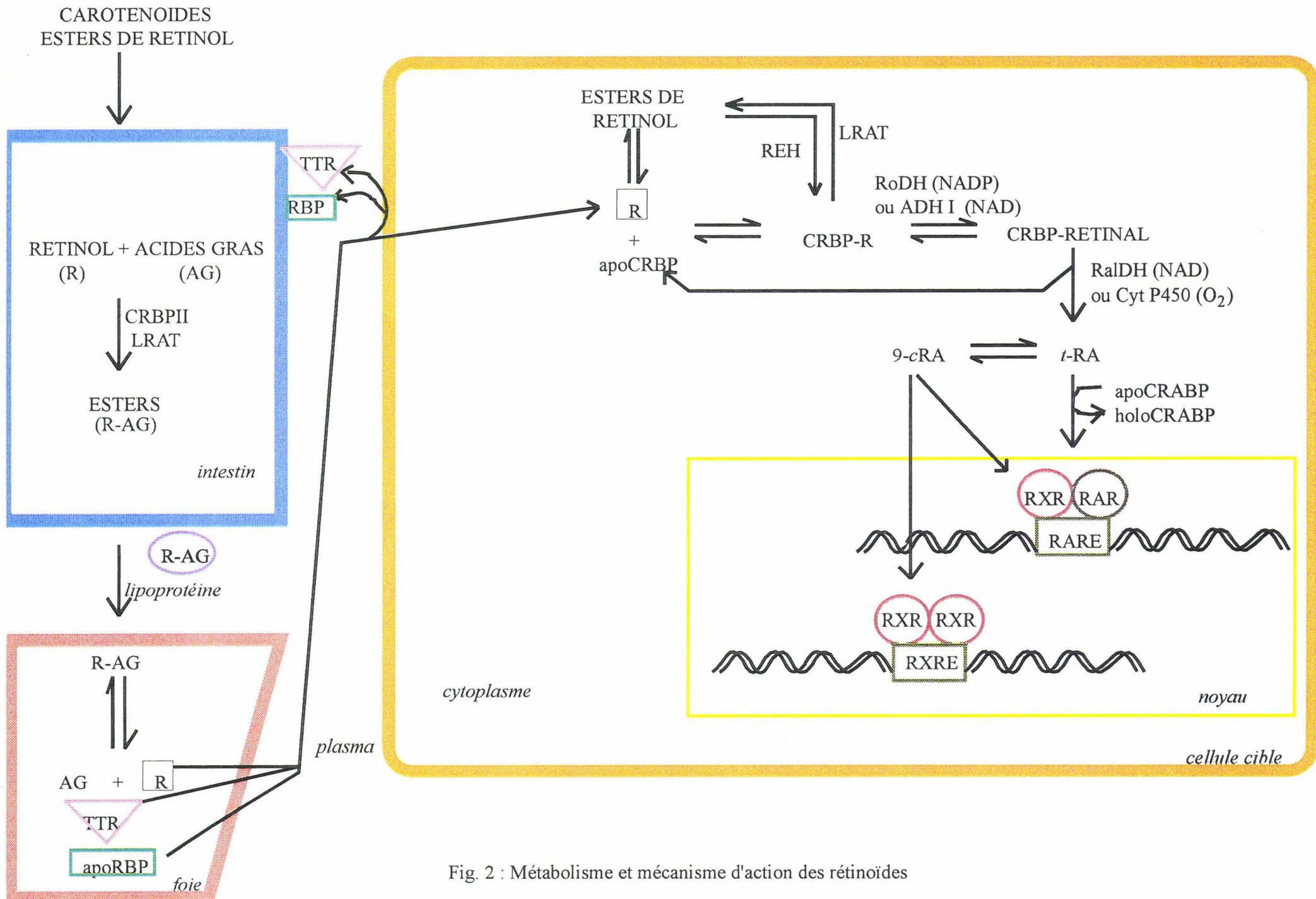


Fig. 2 : Métabolisme et mécanisme d'action des rétinoïdes

Cependant, deux protéines cytoplasmiques capables de lier l'acide rétinoïque, les CRABP I et II, sont retrouvées chez tous les vertébrés et sont fortement conservées (Venepally P. et *al.*, 1996). Ces protéines, de par leur expression selon une distribution particulière chez l'embryon de souris à toutes les étapes du développement, semblent intervenir dans la voie de signalisation des rétinoïdes. Il a été proposé que les CRABPs pouvaient de façon spatio-temporelle contrôler le niveau intracellulaire de l'acide rétinoïque "libre" capable de se lier aux récepteurs nucléaires. Les CRABPs pourraient de manière passive retenir l'acide rétinoïque afin de maintenir la concentration d'acide rétinoïque intracellulaire au niveau d'un seuil tolérable et éviter ainsi des effets tératogènes, et/ou agir comme modulateur du catabolisme de l'acide rétinoïque (Morriss-Kay G., 1993, Fiorella P.D. et Napoli J.L., 1991, Boylan J.F. et Gudas L.J., 1992). Les CRABPs pourraient également être impliquées dans le transfert de l'acide rétinoïque du cytoplasme aux récepteurs nucléaires (Takase S. et *al.*, 1986). Cependant, Gorry P. et *al.* ont montré par la viabilité de souris dépourvues de CRABP I et II que ces protéines ne possèdent pas un rôle crucial au cours du développement (Gorry P. et *al.*, 1994, Lampron C. et *al.*, 1995) et que par conséquent, elles ne semblent pas directement impliquées dans la voie de signalisation des rétinoïdes.

2. Activités biologiques des rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des composés aux actions pléiotropiques. Leurs nombreuses propriétés permettent de les utiliser en prévention et en thérapie cancéreuse : inhibition de la prolifération cellulaire, induction de la différenciation cellulaire, régulation de l'apoptose (ou mort cellulaire programmée), immunomodulation, inhibition de l'angiogénèse et influence sur l'expression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur. Les rétinoïdes ont un effet inhibiteur sur la carcinogénèse des animaux. Ils retardent ou préviennent le développement des tumeurs de la peau, du poumon, de la vessie, du sein et d'autres organes. De plus, ils possèdent d'autres propriétés importantes en dermatologie telles qu'un effet antikératinisant et un effet protecteur contre les agressions photosensibilisantes. Chaque rétinoïde possède un profil de propriété propre qui lui permet d'être utile et spécifique en dermatologie clinique ou en oncologie. De plus, il a été montré qu'une carence aussi bien qu'un excès de rétinoïdes pouvait conduire à des malformations embryonnaires. Des études récentes tentent d'élucider le rôle des rétinoïdes dans le développement embryonnaire (Means A.L. et Gudas L.P., 1995, Lohnes D. et *al.*, 1995).

2.1. Développement

Les rétinoïdes, métabolites de la vitamine A, sont fortement impliqués au cours du développement embryonnaire des vertébrés. Le rôle majeur de l'acide rétinoïque dans le développement a longuement été étudié dans le cas de la morphogenèse des membres de poulet. L'organisation antéro-postérieure des membres, en particulier l'apparition ordonnée des différents doigts, semble dépendre de l'activité d'une région du mésenchyme postérieur des bourgeons de membre appelée zone à activité polarisatrice (ZPA). En effet, la greffe de cellules du mésenchyme postérieur des bourgeons de membre dans la partie antérieure d'un bourgeon hôte provoque une spectaculaire duplication en miroir de l'arrangement des doigts (Saunders J.W. et Gasseling M.T., 1968). Tickle C. et *al.* ont montré l'implication des rétinoïdes dans ce processus en remplaçant la greffe de ZPA par l'implantation d'une bille de gel imprégnée d'acide *trans* rétinoïque (Tickle C. et *al.*, 1982). Les mêmes effets de duplication ont été observés, définissant ainsi l'acide *trans* rétinoïque comme l'agent morphogène (fig 3). Néanmoins des études plus approfondies ont montré que le *t*-RA n'était pas le morphogène direct mais déclenchait une cascade d'inductions de gènes à l'origine de la morphogenèse des membres (Noji S. et *al.*, 1991; Wanek N. et *al.*, 1991). En fait, l'une des conséquences produites par la ZPA ou par le *t*-RA et ses récepteurs est la régulation d'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de morphogenèse telle que la famille des gènes *hox* chez l'Homme et la Souris ainsi que le gène *sonic hedgehog* (Means A.L. et Gudas L., 1995) et des gènes de facteurs de croissance. De plus, il est établi qu'une carence en vitamine A ou un excès d'acide rétinoïque peut entraîner des effets tératogènes chez l'embryon. La plupart des études sur les effets tératogènes se focalisent sur l'action de *t*-RA et de ses stéréoisomères 9-*cis* et 13-*cis* RA, ainsi que de l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque et l'acide 4-oxo-rétinoïque. Deux autres dérivés du rétinol, l'anhydrorétinol et le 14-hydroxy-4,14-rétrorétinol (14-HRR) jouent également un rôle important dans la croissance de certaines lignées cellulaires. Au début du développement des vertébrés, l'axe central antéro/postérieur (comprenant le tube neural) se constitue et le *t*-RA exogène peut provoquer de profonds effets tératogènes sur la formation de cet axe et des structures qui en dérivent. L'acide rétinoïque induit une large variété de malformations chez les vertébrés impliquant les structures cranofaciales, cardiaques, le thymus et le système nerveux central (Means A.L. et Gudas L., 1995). Les effets tératogènes des rétinoïdes au niveau de la différenciation proximo/distale et du développement antéro/postérieur indiquent que les rétinoïdes endogènes jouent un rôle à ce niveau.

2.2. Prolifération - Différenciation cellulaire - Apoptose

- Prolifération et différenciation cellulaire

Le rôle majeur des rétinoïdes réside dans leur activité de différenciation cellulaire et tissulaire. Les effets des rétinoïdes ont été étudiés sur de nombreuses lignées cellulaires et plus particulièrement sur la lignée promyélocytaire de leucémie humaine HL-60 qui se différencie en granulocytes sous l'effet de *t*-RA (Breitman T.R. et *al.*, 1980) ainsi que sur la lignée cellulaire F9, cellules de carcinome de souris embryonnaire qui se différencient en endoderme pariétal. La différenciation cellulaire se caractérise donc par une réduction de la prolifération cellulaire, une augmentation de la capacité d'adhésion des cellules, une diminution des propriétés invasives, l'expression de marqueurs spécifiques d'un type cellulaire. Ces phénomènes sont en fait le résultat d'une altération de l'expression de nombreux éléments de la machinerie cellulaire comme des hormones peptidiques (hormones de croissance), des facteurs de croissance et leurs récepteurs (EGF, TGF, interleukines, interférons), des facteurs de transcription, des protéines de structure, des enzymes (ornithine décarboxylase, alcool déshydrogénase) (Gudas L.J. et *al.*, 1994).

- Apoptose

L'apoptose est régulée par un grand nombre de gènes et joue un rôle essentiel dans les processus biologiques fondamentaux tels que le développement embryonnaire et foetal et le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Steller H., 1995). Le processus de mort cellulaire programmée est généralement défini par les critères morphologiques suivants : une individualisation des cellules, une condensation et une fragmentation nucléaire puis une fragmentation cytoplasmique générant des corps apoptotiques. Ces dernières années, des études génétiques, biochimiques et cellulaires ont montré que l'apoptose pouvait être déclenchée par toute une variété de signaux intrinsèques ou extrinsèques et par conséquent, dans certains cas, par les rétinoïdes *via* les récepteurs nucléaires activant la transcription de gènes liés au processus apoptotique. Cependant, bien qu'actuellement de nombreux travaux démontrent leur implication, leur rôle est encore mal défini.

2.3. Thérapeutique

2.3.1. Thérapeutique des hémopathies malignes

L'altération des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque est un modèle de base de cancers humains, incluant la leucémie à promyélocytes aiguë (APL). L'APL est une variété de leucémie aiguë myéloïde à caractères très spécifiques (Degos L. et *al.*, 1994): morphologiques (prolifération de promyélocytes anormaux bloqués à ce stade de différenciation), cytogénétiques (translocation 15;17 entraînant une fusion entre le gène de la protéine promyélocytaire leucémique (PML) situé sur le chromosome 15 et le gène codant pour le RAR α situé sur le chromosome 17 (fig 4)) et des troubles de la coagulation. Cette maladie est un des modèles clés de la thérapie de différenciation utilisant l'acide rétinoïque en association à la chimiothérapie conventionnelle pour induire la différenciation de cellules blastiques avec une rémission complète chez les patients dans 70% des cas (Chomienne C. et *al.*, 1990, Huang M. et *al.*, 1988). Ainsi les rétinoïdes apparaissent être des régulateurs essentiels de la différenciation. En dehors de l'APL, d'autres hémopathies ont été traitées par les rétinoïdes telles que les syndromes myélodysplasiques (Greenberg B. R. et *al.*, 1985), le syndrome myélomonocytaire chronique de l'enfant (Castelberry R.P. et *al.*, 1994), les leucémies aiguës autres que l'APL et le myélome multiple (Vesole D. et *al.*, 1993). Toutefois, les résultats obtenus sont plus modestes et restent dans l'ensemble à démontrer.

2.3.2. Thérapie cancéreuse et chimioprévention

Par leurs effets sur la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose, les rétinoïdes exercent un large champ d'action sur de nombreuses tumeurs humaines. Ils inhibent les effets transformants des carcinogènes chimiques, physiques ou viraux. Ils répriment également le développement des tumeurs dans plusieurs modèles carcinogéniques. Actuellement, peu d'essais ont permis de vérifier les effets des différents rétinoïdes en thérapie anticancéreuse. Cependant, il est possible d'en citer quelques-uns déjà réalisés. Le *Xeroderma pigmentosum*, par exemple, maladie cutanée héréditaire caractérisée par l'apparition de kératose dès que le sujet s'expose à la lumière, peut être traitée par le 13-*cis* RA. De plus, après arrêt du traitement, une diminution drastique d'incidence de nouvelles lésions est observée. Ceci permet donc de suggérer que les rétinoïdes bloquent une des dernières étapes de la carcinogénèse. D'autres modèles prouvent que les rétinoïdes empêchent

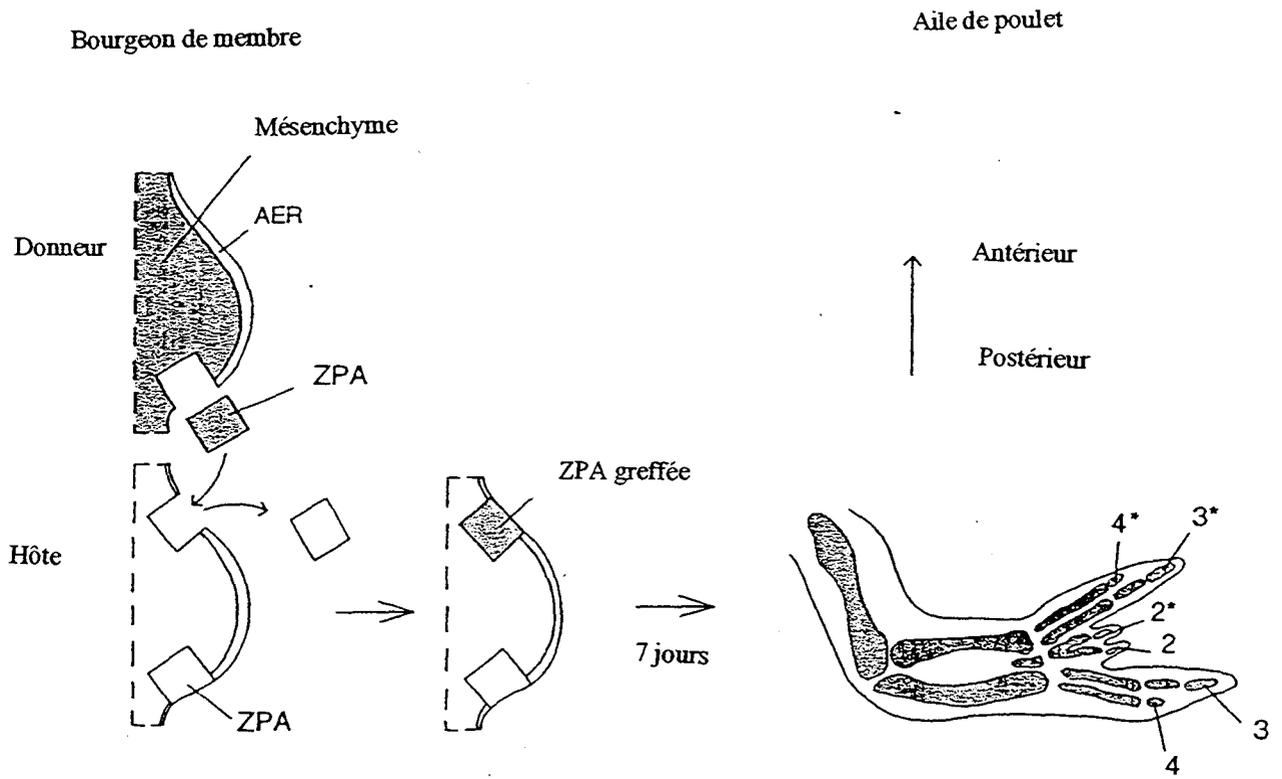


Fig. 3 : Polarisation antéro-postérieure des membres par le mésenchyme postérieur des bourgeons de membres (Hofmann C. et Eichele G., 1994)

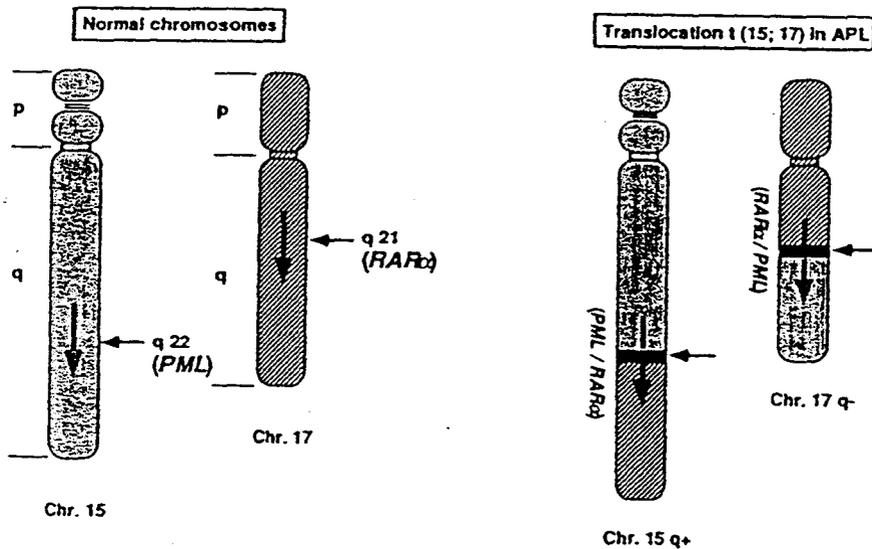


Fig 4 : Translocation chromosomique dans l'APL (Mangelsdorf D.J. et al., 1994)

la carcinogénèse chez les individus porteurs de lésions pré malignes qui présentent un haut risque de développer un cancer des voies aérodigestives (De Thé H. et Degos L., 1997).

Au niveau des cellules pulmonaires, les rétinoïdes agissent sur l'épithélium bronchique normal en induisant la synthèse des mucines et en bloquant la différenciation squameuse aberrante (Wu R. et *al.*, 1990 et Setten A.M. et *al.*, 1992). De plus, une déficience en vitamine A est associée au développement de métaplasies squameuses de l'épithélium bronchique et favorise par conséquent, la susceptibilité de développer un cancer du poumon (Benner S.E. et *al.*, 1995 Hong W.K. et Itri L.M., 1994). Actuellement, plusieurs essais de prévention du cancer du poumon ont été réalisés sur des animaux en utilisant la vitamine A et différents rétinoïdes. Les rétinoïdes, seuls ou en combinaison avec un antioestrogène ou des interférons, inhibent également *in vitro* la croissance cellulaire à partir de tumeurs du cancer du sein (Lama G. et *al.*, 1996). Malheureusement, des essais cliniques chez des patients atteints de cancer du sein à un stade tardif n'ont pas montré de rémission significative par un traitement avec les rétinoïdes. Par conséquent, ces études indiquent que les rétinoïdes possèdent une activité inhibitrice sur les cellules cancéreuses en début de progression tumorale et que leur efficacité diminue dès que la tumeur devient plus invasive.

Ces différents résultats d'essais cliniques prouvent qu'il est indispensable de développer d'autres rétinoïdes de synthèse plus efficaces et moins toxiques. De plus, jusqu'en 1996, l'utilisation de *t*-RA comme agent anticancéreux était basée sur sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire et à promouvoir la différenciation de certaines cellules néoplasiques. Cependant, le *t*-RA se comporte différemment selon les conditions de culture et pourrait dans certains cas stimuler la prolifération cellulaire (Takatsuka J. et *al.*, 1996). Il serait donc possible d'établir une corrélation entre l'inhibition de la prolifération cellulaire par *t*-RA et le métabolisme intracellulaire de *t*-RA. Des cellules qui favoriseraient l'oxydation de *t*-RA ne proliféreraient pas alors que des cellules ne métabolisant pas l'acide rétinoïque stimuleraient la prolifération. De ce fait, il serait possible d'établir de nouvelles stratégies de thérapie cancéreuse par les rétinoïdes, en excluant l'idée que le *t*-RA seul inhibe la prolifération cellulaire. De plus, en développant des rétinoïdes de synthèse plus actifs et moins toxiques que les rétinoïdes naturels, il serait possible de cibler davantage les tissus malins et de mieux adapter les traitements.

2.3.3. Dermatologie : acné et psoriasis

La peau humaine est composée de l'épiderme qui recouvre le derme. Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme. Ils migrent de la couche basale où a lieu la division cellulaire, au travers des couches suprabasales pour former après une étape terminale de différenciation, une barrière protectrice en surface, la couche cornée. Une simple application de *t*-RA à 0,1% pendant 4 jours stimule la prolifération des kératinocytes, augmentant ainsi le nombre de cellules de la couche épidermique et par conséquent l'épaisseur de l'épiderme (Fisher G.J. et *al.*, 1991). Ainsi, *in vivo*, les rétinoïdes stimulent la prolifération des kératinocytes. Le psoriasis est la maladie la plus connue traitée par les rétinoïdes. Bien que les rétinoïdes utilisés en monothérapie aient un effet modéré dans le traitement de plaques de psoriasis, ils représentent un puissant adjuvant dans les multiples combinaisons pharmacologiques établies selon le type et l'étendue du psoriasis. L'acné caractérisé par une augmentation de la production de sébum, la formation de comédons, la colonisation bactérienne et l'inflammation est également traité par différentes combinaisons de rétinoïdes, de façon locale ou par voie orale, en association avec des antibiotiques. Les rétinoïdes sont donc des agents thérapeutiques très importants en dermatologie, en particulier dans le traitement du psoriasis et d'autres maladies impliquant une hyperkératinisation.

III. Rétinoïdes de synthèse

La vitamine A, le *t*-RA et ses dérivés sont essentiels à divers événements biologiques. Cependant, leur utilisation clinique reste limitée compte tenu de leurs effets toxiques et tératogènes. Il était donc nécessaire de synthétiser de nouvelles molécules à activité rétinoïde pour tenter de palier ces problèmes. (Définition des différents termes caractérisant les ligands : tab. 1).

1. Définition

Jusqu'en 1982, les rétinoïdes étaient chimiquement définis comme "des diterpénoïdes dérivant d'un composé parent monocyclique contenant 5 doubles liaisons carbone-carbone et un groupement fonctionnel à l'extrémité terminale d'une portion acyclique" (IUPAC-IUB). Par cette définition, les rétinoïdes étaient réduits aux composés proches du rétinol. Or,

DEFINITIONS

Ligand	Molécule douée d'une capacité d'interaction avec un récepteur
Ligand agoniste	Composé qui induit l'activité transcriptionnelle <i>via</i> les récepteurs nucléaires
Ligand spécifique	Ligand interagissant de façon saturable et de haute affinité avec son récepteur
Ligand sélectif	Ligand capable de reconnaître particulièrement une sous-classe de récepteur
Ligand panagoniste	Molécule qui se lie aux deux classes de récepteurs (RAR et RXR)
Ligand antagoniste	Composé qui bloque l'action d'un ligand agoniste
Ligand agoniste inverse	Composé capable de réprimer l'activité transcriptionnelle basale du récepteur en absence de ligand agoniste

Tab 1 : Définitions des termes caractérisant les ligands

plusieurs composés présentent une activité similaire au *t*-RA avec une structure nettement différente de celle décrite précédemment. La définition proposée par Sporn M.B. est alors plus biologique : “un rétinoïde est une substance qui peut induire une réponse biologique spécifique par liaison et activation d’un récepteur spécifique ou d’une série de récepteurs” (Sporn M.B. et *al.*, 1986).

2. Evolution structurale des rétinoïdes

Les rétinoïdes actuels présentent des structures très éloignées de *t*-RA et définissent trois générations de dérivés.

- Les rétinoïdes de première génération

Ils proviennent de la modification de l’extrémité polaire de la chaîne latérale polyénique de *t*-RA. Ils se distinguent par la nature de leur groupement substituant (alcools, aldéhydes, acides, esters, amines, amides ou éthers), par la longueur de leur chaîne latérale et par le nombre et la position de doubles liaisons et de substituants méthyles. L’acide 13-*cis* rétinoïque (ou isotrétinoïne) est le premier exemple de molécule appartenant à ce groupe et est utilisé pour le traitement de l’acné.

- Les rétinoïdes de deuxième génération

Ils sont obtenus par la modification de l’extrémité cyclique de la vitamine A par divers cycles ou hétérocycles, substitués ou non. Les composés les plus intéressants possèdent un cycle aromatique porteur de groupements méthyles, méthoxy ou d’halogènes. L’étrétinate utilisé dans le traitement du psoriasis et des dermatoses kératinisantes appartient à ce groupe.

Les rétinoïdes de la première et de la deuxième génération correspondent à des analogues simples de l’acide rétinoïque et sont donc des polyènes.

- Les rétinoïdes de troisième génération : aromatisation de la chaîne polyénique et modification du squelette carboné.

Ils sont toujours en cours de développement. Ils regroupent les dérivés présentant différentes formes de cyclisation englobant l’ensemble ou une partie de la chaîne polyénique et des modifications du squelette carboné. L’aromatisation de la chaîne polyénique s’est

avérée être une approche très intéressante dans l'obtention de nouveaux rétinoïdes. Dans un premier temps, des molécules contenant un cycle benzénique dans leur chaîne latérale, notamment au niveau de la double liaison 11E-13E, ont été synthétisées. Ces composés présentant une activité significative sur les cultures de cellules de la trachée ou de papillomes (Dawson M.I. et *al.*, 1981; 1990), apportaient de nouvelles possibilités de synthèse de rétinoïdes. En parallèle, d'autres dérivés rétinoïdes aromatiques formés d'un double cycle ont été élaborés. La combinaison de l'aromatisation en C₈-C₁₈ et de l'aromatisation en C₁₂-C₁₄ a permis d'obtenir l'acide (5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-naphthalamyl)propenyl benzoïque, le TTNPB (ou Ro13-7410) et son éthylester (arotinoïde), molécules possédant une très forte activité liée à leur nature stable et hydrophobe (Loeliger P. et *al.*, 1980). Ensuite, en rigidifiant la structure de la molécule par l'introduction d'un nouveau cycle benzoïque, des composés naphthaléniques ont été obtenus comptant parmi eux le CD367 (acide 4(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-anthracényl benzoïque) présentant une activité similaire à celle de *t*-RA (Dawson M. et *al.*, 1983). La modification du squelette carboné a permis d'obtenir des molécules de type amide tel que l'Am80 (acide 4-((5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphthalényl)carbamoyl)benzoïque) dont l'étude complète du métabolisme a été effectuée chez le rat (Mizojiri K. et *al.*, 1997 a, b, c, d, e) et l'Am580 (acide 4-((5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphthalényl)carboxamido)benzoïque ou CD336) ou de type chalcone comme le Ch55 possédant une activité rétinoïde semblable à celle de *t*-RA (Kagechica H. et *al.*, 1988; 1989 a, b, c ; Yamakawa T. et *al.*, 1990). Il est intéressant de noter que le Ch55 ne se lie pas aux CRABPs, confirmant le fait que ces protéines ne jouent pas un rôle essentiel dans le mécanisme d'action des rétinoïdes (Jetten A.M. et *al.*, 1987, Takagi K. et *al.*, 1988, Sato M. et *al.*, 1988).

Le développement de nouveaux rétinoïdes synthétiques a permis d'aboutir à la synthèse d'agonistes et d'antagonistes spécifiques et sélectifs des différentes classes de RARs et des RXRs avec des applications thérapeutiques mieux définies.

3. Spécificité des ligands

L'activité des rétinoïdes s'effectue grâce aux récepteurs nucléaires, les RARs et les RXRs, qui régulent l'activation transcriptionnelle de gènes par l'intermédiaire de sites spécifiques sur l'ADN ou grâce à la répression de facteurs de transcription AP-1 qui sont en

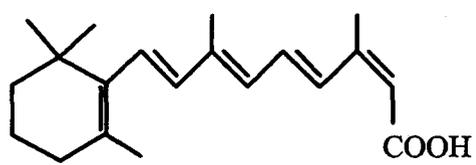
général responsables de la prolifération cellulaire. Ces deux types de facteurs de transcription possèdent des mécanismes d'action distincts permettant l'identification de rétinoïdes spécifiques de chacun d'eux.

3.1. Ligands spécifiques des RARs

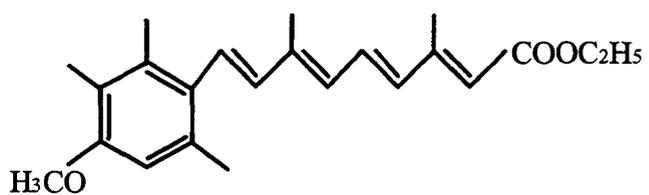
Les rétinoïdes régulent l'expression de gènes par l'intermédiaire de deux classes de récepteurs nucléaires : les RARs (α , β et γ) (Allenby G. et *al.*, 1994) et les RXRs. Chez l'animal adulte, la distribution cellulaire des RARs est spécifique. Par exemple, RAR γ est retrouvé principalement au niveau de la peau, RAR β se localise au niveau du coeur, du poumon et de la rate, et RAR α est ubiquitaire chez l'adulte et l'embryon. De plus, l'expression transitoire des différents RARs dans les tissus embryonnaires implique que chaque RAR possède un rôle déterminé au cours de l'embryogenèse. Compte tenu de ces observations, des rétinoïdes sélectifs de chaque type de récepteur, permettraient un meilleur ciblage thérapeutique comparé aux ligands protagonistes des RARs (fig. 5).

3.1.1. Ligands sélectifs de RAR α

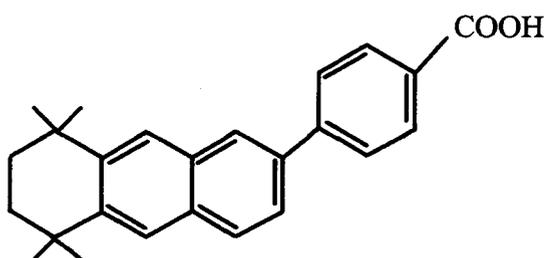
Un progrès considérable dans la synthèse de ligands sélectifs a été effectué avec l'Am580. Cette molécule qui possède une liaison amide, se lie préférentiellement à RAR α (Kagechika H. et *al.*, 1988, Delescluse C. et *al.*, 1991). En effet, le fait d'introduire une liaison amide polaire, hydrophile dans le squelette arétinoïde du TTNPB pour former l'Am580 présageait une diminution d'affinité de liaison de cette molécule par rapport au TTNPB pour les trois récepteurs α , β et γ . Ceci s'est vérifié pour les récepteurs RAR β et RAR γ mais pas pour RAR α qui lie aussi bien l'Am580 que le TTNPB suggérant ainsi une stabilisation sélective dans l'interaction avec RAR α grâce à la liaison amide. A la suite de cette observation, Teng M. et *al.*, ont systématiquement greffé des groupements substituants sur les cycles aromatiques de façon à potentiellement affecter les propriétés de la liaison amide. De cette façon, ils ont identifié une série de composés analogues présentant une grande affinité de liaison et une forte sélectivité pour RAR α . L'AGN193836 est le plus sélectif de ces composés pour RAR α (Teng M. et *al.*, 1996). Son affinité de liaison pour RAR β est de mille fois inférieure à celle pour RAR α et non mesurable pour RAR γ . De plus, il favorise exclusivement la transactivation par RAR α . (Ligands sélectifs de RAR α : fig 6)



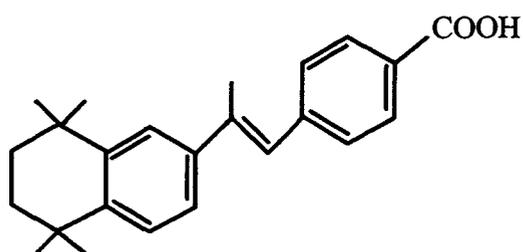
13c-RA



Etrétinate

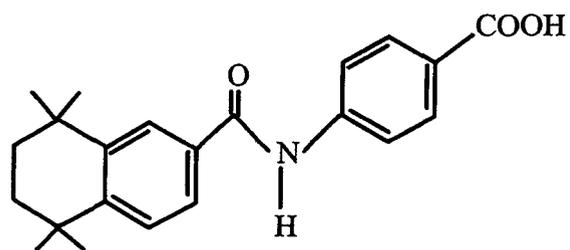


CD367

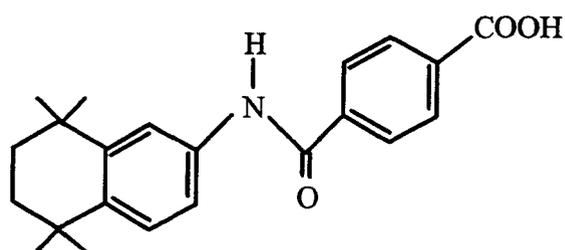


TTNPB

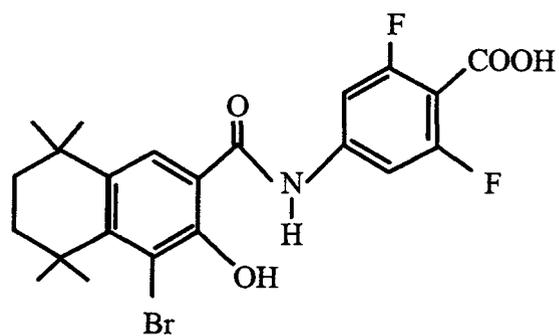
Fig. 5 : Ligands synthétiques agonistes des RARs



Am580



Am80



AGN193836

Fig. 6 : Ligands sélectifs de RAR α

3.1.2. Ligands sélectifs de RAR β

Le TTNN (ou CD135), ligand sélectif partiel envers RAR β et RAR γ (Delescluse C. et *al.*, 1991), est la molécule qui a servi de modèle de base à la synthèse du CD2019 et du CD417. Ils présentent chacun une sélectivité d'affinité de liaison partielle vis-à-vis de RAR β (Martin B. et *al.*, 1992) et le CD417 possède également une sélectivité pour RAR β en transactivation. Le rétinoïde de type chalcone Ch55 est également un ligand β -sélectif.

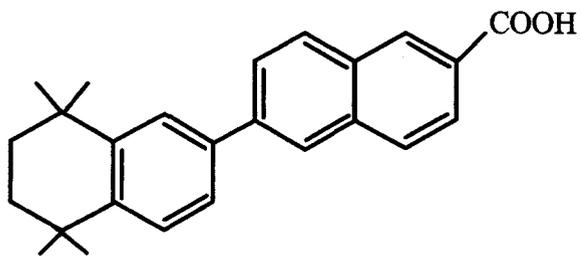
Chandraratna R.A.S. et *al.* ont développé une nouvelle génération de rétinoïdes sélectifs appartenant à la classe des rétinoïdes acétyléniques. Ils ont réduit la mobilité des molécules en remplaçant la chaîne polyénique de *t*-RA par une triple liaison linéaire. Le tazarotène (ou AGN190168) est le premier composé appartenant à cette nouvelle génération. C'est un éthylester avec un atome de soufre au niveau de son hétérocycle (permettant une oxydation rapide lors de son métabolisme). Le tazarotène, lui-même, ne lie ni les RARs ni les RXRs mais sa forme active, l'acide tazaroténique (obtenue après estérification) possède une sélectivité RAR β et γ , en plus de ses excellentes propriétés rétinoïdes (Esgleyes-Ribot T. et *al.*, 1994, Chandraratna R.A.S., 1996). Des essais cliniques ont déjà débuté afin de mettre au point un traitement local de l'acné et du psoriasis par l'application d'un gel de tazarotène (Chandraratna R.A.S., 1997, Weinstein G.D. et *al.*, 1997). D'autres ligands analogues comprenant une triple liaison et des substituants 1,2,3,4-tétrahydroquinoline et 3,4-(1H)-dihydroquinolin-2-one, présentent aussi une activité biologique RAR β et RAR γ sélective (Beard R.L. et *al.*, 1997). Compte tenu de ces éléments, Johnson A.T. et *al.* ont imaginé une structure caractéristique apparaissant responsable de la spécificité RAR β observée par l'activité transactivatrice mais avec une faible influence sur la sélectivité de liaison. Cette nouvelle série de rétinoïdes comprend l'AGN193174 et l'AGN193639 de sélectivité RAR β . Chacune de ces molécules est substituée en C₈ du cycle dihydronaphtalène par un groupement 2-thiényle. L'AGN193639 semble particulièrement intéressant. En effet, il a été montré qu'un groupement amide dans la partie reliant la région hydrophobe au groupe carboxyle attribuait une sélectivité de liaison et de transactivation RAR α . Cependant, à l'inverse, ce composé qui possède bien une liaison amide, ne transactive qu'en présence de RAR β . D'où l'hypothèse suivante : la présence d'un groupement 2-thiényle en C₈ du cycle dihydronaphtalène confère exclusivement une sélectivité de transactivation RAR β (Johnson A.T. et *al.*, 1996). De plus, par des essais de cotransfection en utilisant une concentration constante en *t*-RA, ils ont

observé une inhibition dose dépendante de l'activité transactivatrice de *t*-RA, démontrant la capacité de ses composés à agir comme antagonistes de *t*-RA *via* RAR α et RAR γ . Ce type d'activité biologique a également été mis en évidence par le groupe de Gronemeyer qui a identifié des rétinoïdes synthétiques capables d'induire la transactivation par RAR β et d'agir comme antagonistes vis-à-vis de *t*-RA en présence de RAR α ou RAR γ (Chen J-Y. et *al.*, 1995). Ils ont alors utilisé ces rétinoïdes pour mettre en évidence une dissociation possible des fonctions de transactivation et de transrépression des RARs.

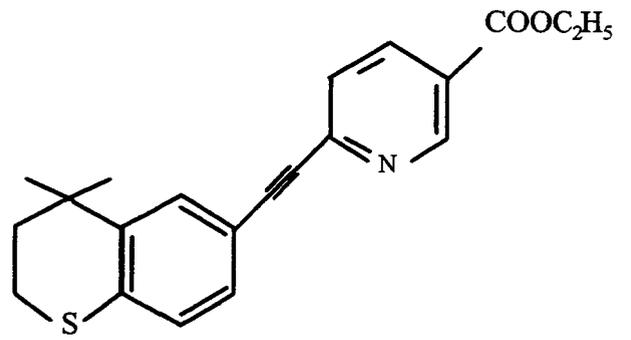
Plus récemment, de nouvelles molécules ont été synthétisées sur la base structurale du TTNN (Diaz P. et *al.*, 1997) pour obtenir des molécules plus ou moins spécifiques de RAR β et RAR γ . Ces acides naphthoïques selon la substitution de leur premier cycle benzénique par une fonction polaire (hydroxyle) en ortho ou un groupement adamantyle ou une liaison biaryle en para, présentent une prédisposition de sélectivité de liaison pour RAR γ . Ou alors, en l'absence d'une conjugaison de liaisons entre les deux groupements aryles, ils sont partiellement sélectifs de RAR β . (Ligands sélectifs de RAR β/γ : fig 7, ligands sélectifs de RAR β : fig 8).

3.1.3. Ligands sélectifs de RAR γ

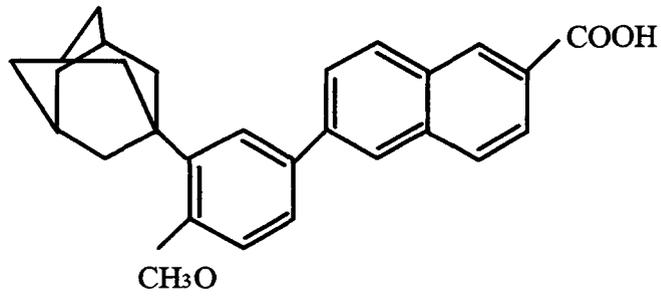
RAR γ représentant une cible majeure de *t*-RA au niveau de la peau humaine, il était important de développer des rétinoïdes sélectifs de ce récepteur. L'adapalène ou CD271 a été le premier composé identifié comme partiellement sélectif de RAR β et γ (Bailly J. et *al.*, 1990). C'est un dérivé d'acide naphthoïque stable, substitué par un groupement adamantyle et une fonction méthoxy en C₆ et C₅ du cycle benzoïque respectivement et qui de part ses propriétés pharmacologiques spécifiques des rétinoïdes et ses capacités anti-inflammatoires, peut être utilisé dans le traitement de l'acné (Shroot B. et *al.*, 1997). Par le remplacement du groupement méthoxy par un groupement hydroxyle, il en découle le CD437 (acide 6-(3-(1-adamantyl)-4-hydroxy-phényl)-2-naphthoïque). Cette simple modification chimique est apparemment suffisante pour modifier la sélectivité RAR β et γ partielle en sélectivité RAR γ (Shroot B. et *al.*, 1991). L'effet de ce groupement hydroxyle dans la sélectivité pour RAR γ est confirmé par les deux composés CD1530 et CD666 portant également un groupement OH au milieu d'une partie hydrophobe de la molécule (Bernard B.A. et *al.*, 1992).



TTNN

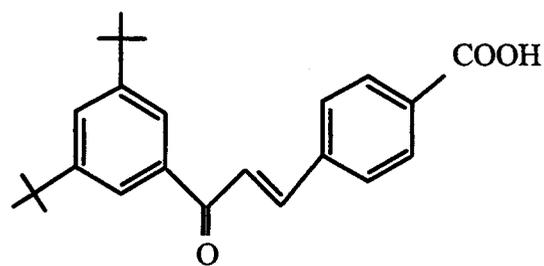


AGN 190168 (Tazarotène)

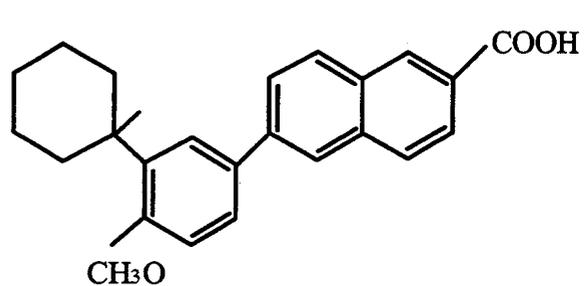


CD271 (Adapalène)

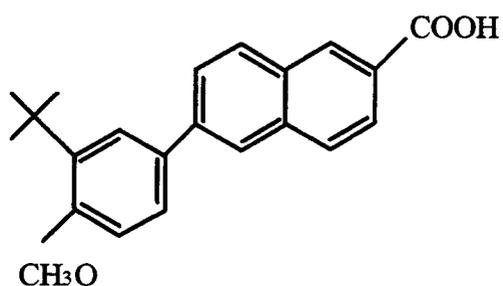
Fig. 7 : Ligands sélectifs de RAR β/γ



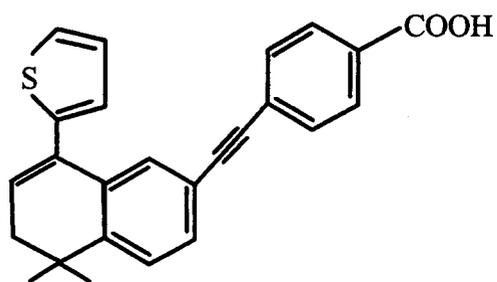
Ch55



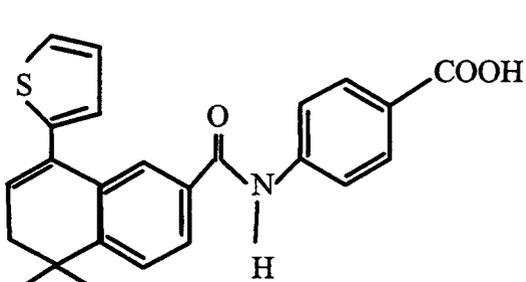
CD2019



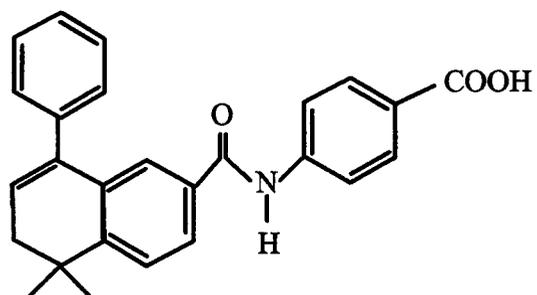
CD417



AGN 193174



AGN 193639



BMS 185411

Fig. 8 : Ligands sélectifs de RAR β

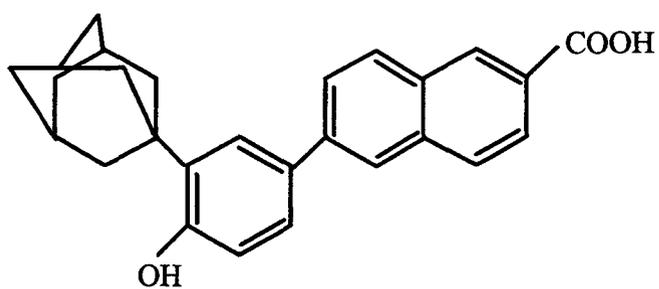
Parmi les ligands spécifiques des RARs, Graupner et *al.* ont montré la sélectivité de liaison pour RAR γ d'acides naphthoïques (Graupner G. et *al.*, 1991). En s'appuyant sur ces résultats et ceux de Reczek et *al.*, montrant une activité biologique préférentielle selon le type d'énantiomère (R) des ligands portant une fonction alcool (Reczek P.R. et *al.*, 1995), Yu K.L. et *al.* ont émis l'hypothèse que la sélectivité du récepteur pouvait être due au type de liaison entre le groupement tétrahydrotétraméthylnaphtalène et l'acide naphthoïque. Ils ont alors synthétisé une série de dérivés de l'acide naphthoïque (appelée BMS) avec une configuration sp³ ou sp² sur l'atome de carbone central, sélectifs de RAR β et γ (la molécule, BMS185354 encore appelée SR11254, substituée par un groupement oxime (=N-OH) est particulièrement sélective de RAR γ) (Yu K.L. et *al.*, 1996). D'autre part, en construisant des molécules tronquées au niveau d'un des cycles du groupement d'acide naphthoïque (comme les dérivés du CD666), ils ont mis en évidence l'importance du cycle A dans la sélectivité β et γ des acides naphthoïques (Yu K.L. et *al.*, 1996). (Ligands sélectifs de RAR γ : fig 9). (En récapitulatif : ligands sélectifs des RARs : tab2).

3.1.4. Antagonistes et agonistes inverses des RARs

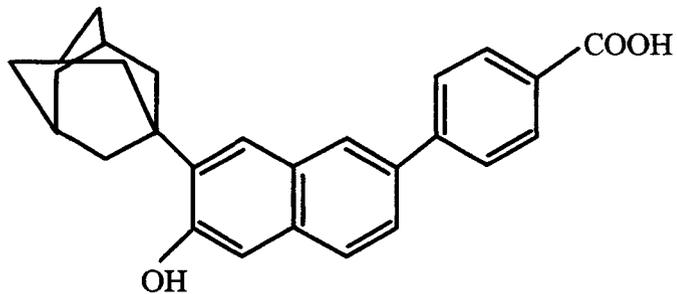
- Antagonistes

Dans la famille des récepteurs stéroïdiens les effets d'antagonistes comme des anti-progestatifs tels que le RU-486 ou des anti-oestrogènes tels que le 4-hydroxytamoxifène ont prouvé leur utilité clinique pour l'interruption volontaire de grossesse (Bygdeman M. et *al.*, 1994) et le traitement hormono-dépendant du cancer du sein (Jordan V.C. 1992). Apfel et *al.* ont synthétisé le premier antagoniste sélectif de RAR α , le Ro41-5253 (Apfel C. et *al.*, 1992). Ce composé neutralise l'effet de *t*-RA dans la différenciation des cellules HL-60, l'activation des lymphocytes B polyclonaux et l'activité transactivatrice de RAR α . Le mécanisme moléculaire permettant à un rétinoïde antagoniste de bloquer l'action d'un agoniste n'a pas encore été élucidé bien que des approches par digestion protéolytique du domaine E de RAR α et par cristallographie du domaine de liaison au ligand de ER en présence d'un ligand agoniste ou antagoniste (Brzozowski A.M. et *al.*, 1997) ont montré l'induction d'un changement conformationnel différent par l'antagoniste (Keidel S. et *al.*, 1994).

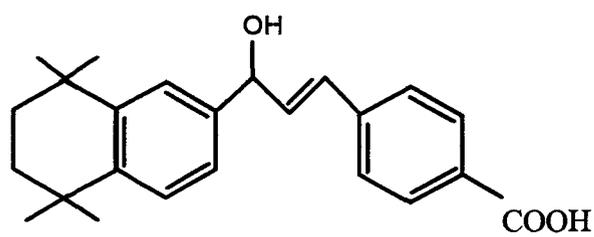
Actuellement, hormis le Ro41-5253, il existe deux classes structurales d'antagonistes, les antagonistes dérivés à structure hétérocyclique contenant un acide benzoïque et les dérivés



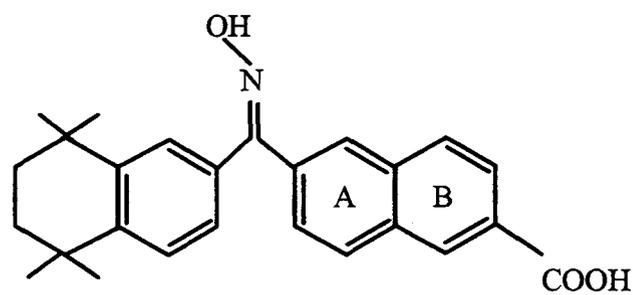
CD437



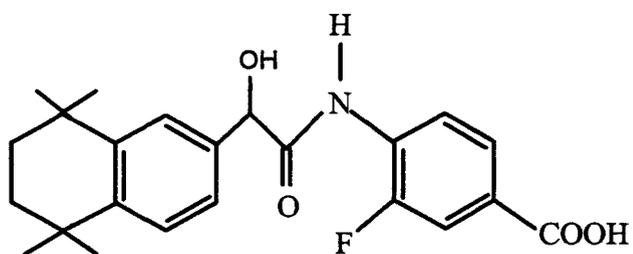
CD1530



CD666



BMS 185354 ou SR11254



BMS961

Fig. 9 : Ligands sélectifs de RAR γ

Ligands	Sélectivité	Activité de liaison K_d/K_I (nM)			Système d'expression	Activité transactivatrice EC_{50} (nM)			Type cellulaire	Références
		RAR α	RAR β	RAR γ		RAR α	RAR β	RAR γ		
<i>t</i> -RA	$\alpha/\beta/\gamma$	13	5.5	3.5	COS-7	2.1	3.6	2.5	Hela	Delescluse C. et al. (1991)
9-cRA	$\alpha/\beta/\gamma$	22	10.9	20	Baculovirus	304	52	74	CV-1	Zhang L.; et al. (1996)
CD367	$\alpha/\beta/\gamma$	3	4	1.5	COS-7	0.2	0.37	0.25	Hela	Delescluse C. et al. (1991)
TTNPB	$\alpha/\beta/\gamma$	36	5	26	COS-7	30	3	2	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
Am80	α	22	280	1720	COS-7	1.5	6.9	149	Hela	Delescluse C. et al. (1991)
Am580	α	6	130	827	COS-7	0.36	25	28	Hela	Delescluse C. et al. (1991)
AGN193836	α	8.4	7374	>30000	Baculovirus	~700	NM	NM	CV-1	Teng M. et al. (1996)
TTNN	β/γ	580	13	40	COS-7					Willhite C.C. et al. (1996)
CD271	β/γ	1100	34	130	COS-7	29	2	9	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
Ch55	β	0.44	0.04	1.7						Sun S-Y. et al. (1997)
CD2019	β	920	26	160	COS-7	19.8	3.8	46.9	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
CD417	β	6500	36	426	COS-7	71.1	3.56	69.10	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
AGN193174	β	129	20	104	Baculovirus	NM	25	NM	CV-1	Johnson A.T. et al. (1996)
AGN193639	β	94	996	>10 ⁴	Baculovirus	NM	115	NM	CV-1	Johnson A.T. et al. (1996)
CD437	γ	6500	2480	77	COS-7	140	28.4	7.4	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
CD1530	γ	2750	1500	150	COS-7	37.5	28.5	1.8	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)
CD666	γ	2240	2300	68	COS-7	149	50.8	1.4	Hela	Bernard B.A. et al. (1992)

(NM: non mesurable)

Tab. 2 : K_d/K_I et EC_{50} de ligands sélectifs des RARs

des acides acétyléniques. La première classe d'antagonistes a été élaborée par le groupe de Yamanaka (Yoshimura H. et *al.*, 1995). Pour cela, ils ont supposé que le fait d'empêcher la rotation de la liaison centrale de la molécule entre une région hydrophobe et un groupement pyrazole, par l'introduction d'hétérocycles, affecterait la capacité de liaison et l'activité biologique des rétinoïdes. Par cette stratégie, ils ont découvert trois rétinoïdes fortement antagonistes possédant une structure de type acide benzoïque hétérocyclique.

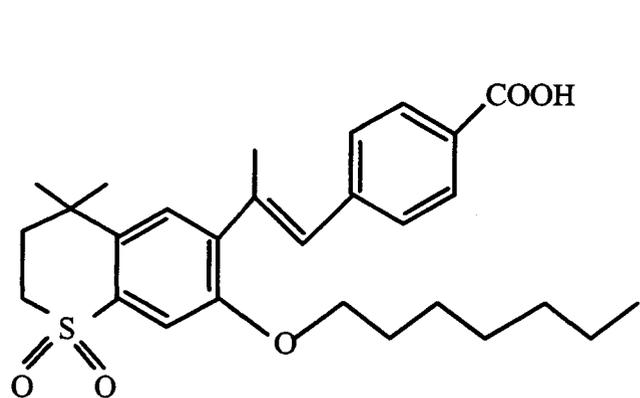
La seconde classe d'antagonistes des RARs, des rétinoïdes diarylacétyléniques tels que l'AGN193109, a été caractérisée par le groupe de Chandaratna. Ce sont de forts antagonistes de *t*-RA au niveau des trois types de RARs (Johnson A.T. et *al.*, 1995). Ils sont construits sur la base structurale de la triple liaison spécifique du tazarotène, agoniste sélectif de RAR β et γ , mais avec des substituants différents et encombrants. Par la suite, il s'est avéré que l'antagoniste, AGN193109, se comportait plus précisément comme un agoniste inverse (explication ci-après).

D'autre part, cette structure a servi de modèle pour élaborer une nouvelle série d'antagonistes plus sélectifs de RAR α . Teng M. et *al.* ont combiné la structure de ligands antagonistes des RARs avec des éléments structuraux procurant la sélectivité RAR α pour obtenir des molécules antagonistes très sélectives telles que l'AGN194574 (Teng M. et *al.*, 1997). Ce composé est un puissant antagoniste de RAR α , il inhibe complètement l'activité de *t*-RA avec des concentrations pratiquement équimolaires et de plus, il est très sélectif car même à une concentration cent fois supérieure à celle de *t*-RA, il ne supprime pas l'activité transactivatrice de RAR γ et ne bloque que partiellement celle de RAR β . D'autres molécules présentent également un antagonisme sélectif de l'un ou l'autre des récepteurs. C'est le cas du BMS185411 qui est un composé agoniste de RAR β mais antagoniste de RAR α (Yu K-L. et *al.*, 1996, Ostrowski J. et *al.*, 1998).

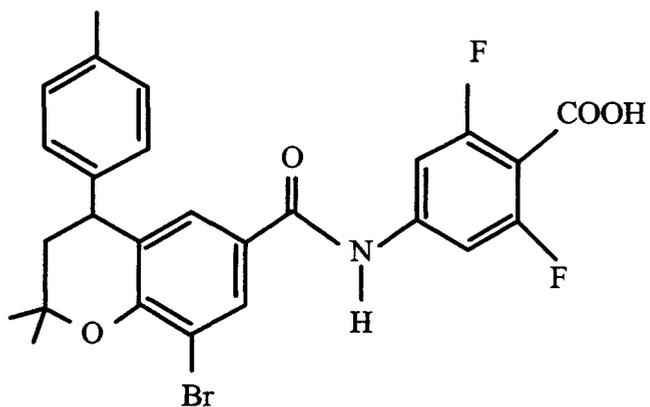
Ces composés pourraient d'une part, être de véritables outils dans l'élucidation du rôle physiologique de RAR α au cours du développement et chez l'animal adulte et d'autre part, être employés à des fins thérapeutiques. (Ligands antagonistes des RARs : fig 10).

-Agonistes inverses

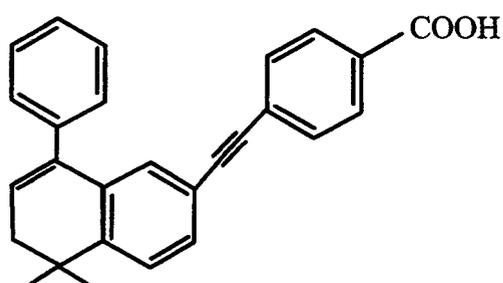
Le concept d'agoniste inverse ou d'antagoniste négatif est né de l'étude de récepteurs couplés à la protéine G pour lesquels certains antagonistes inhibent l'activité des récepteurs



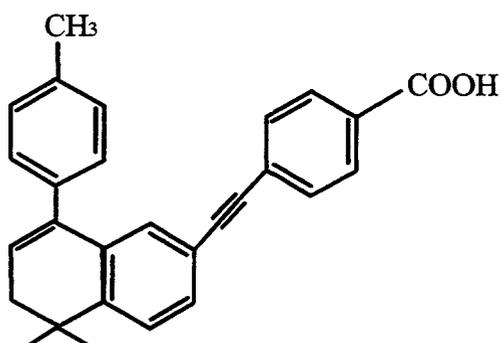
Ro41-5253



AGN194574 (RAR α)



AGN192870 (CD3105)



AGN193109 (CD3106)

Fig. 10 : Ligands antagonistes des RARs

en absence de ligand (De Lean A. et *al.*, 1980, Costa T. et *al.*, 1992 et Chidiac P. et *al.*, 1994). L'agoniste inverse est un ligand capable de réprimer l'activité basale d'un récepteur en absence d'un agoniste exogène. Comme nous l'avons décrit précédemment, une série de rétinoïdes acétyléniques substitués en C₁, expriment une forte activité agoniste de la transactivation par les RARs (Johnson A.T. et *al.*, 1995). Le groupe de Chandraratna a identifié selon le substituant en C₁, deux groupes de ligands antagonistes : les agonistes inverses et les antagonistes neutres (Klein E.S. et *al.*, 1996). Ils ont constaté que les agonistes inverses étaient capables de réguler l'expression de gènes marqueurs de la différenciation (MRP-8) dans des cultures de kératinocytes, différemment d'un rétinoïde classique. Les antagonistes neutres de cette série possèdent en position 4 du groupement phényle, un atome d'hydrogène (AGN192870 ou CD3105) ou de fluor substituant, alors que les substituants des agonistes inverses sont légèrement plus encombrants : un groupement méthyle pour l'AGN193109 ou CD3106, ou un groupement CF₃ ou Cl. En effectuant des traitements simultanés d'AGN193109 et d'AGN193840, ils ont également constaté une compétition entre cet agoniste inverse et cet antagoniste au niveau de la répression de l'activité transcriptionnelle de RAR γ . Ce phénomène d'agonisme inverse pourrait s'expliquer par une rupture de l'équilibre entre les RARs seuls et l'association RARs-corépresseurs en faveur des RARs associés aux corépresseurs. Ainsi, l'AGN193109 pourrait soit favoriser l'interaction des RARs avec des corépresseurs, permettant la régulation de l'expression aussi bien au niveau du récepteur qu'au niveau du "cross-talk" avec les autres récepteurs nucléaires en contact avec un corépresseur commun ; soit agir comme inhibiteur de l'interaction du récepteur avec les composants de la machinerie transcriptionnelle.

3.2. Ligands spécifiques des RXRs

L'acide 9 *cis*-rétinoïque est le ligand naturel par excellence des RXRs. En effet, ces récepteurs sont incapables de lier *t*-RA et ne sont activés que par 9*c*-RA (Cheng L. et *al.*, 1994). Cependant, il est intéressant de noter que RXR α peut également être activé par un autre ligand naturel non rétinoïde, l'acide phytanique (LeMotte P.K. et *al.*, 1996), impliquant ainsi RXR α dans le contrôle du métabolisme des acides gras.

Dans les conditions physiologiques, les RARs et les RXRs forment des hétérodimères capables de se fixer aux régions promotrices des gènes pour moduler leur transcription. Cependant, les RXRs peuvent former des homodimères en présence de ligands spécifiques RXRs et réguler la transcription de gènes en se fixant sur des promoteurs différents de ceux

utilisés par les hétérodimères RAR-RXR. Il faut également noter que les RXRs peuvent s'associer en hétérodimères avec d'autres récepteurs thyroïdiens/stéroïdiens. Les rétinoïdes de synthèse spécifiques des RXRs représentent donc des cibles pharmacologiques potentielles.

3.2.1. Rétinoïdes agonistes des RXRs

Le 9c-RA étant l'isomère Z de *t*-RA, l'équipe d'Apfel C.M. a synthétisé des molécules de même isomérisation. Cependant, aucun de ces composés n'activait les RXRs, ni les RARs. Ils ont néanmoins identifié une molécule proche de *t*-RA et de 9c-RA avec seulement une double liaison en moins entre le C₉ et le C₁₀ de la chaîne polyénique, activant RXR α avec pratiquement autant d'efficacité que le 9c-RA (EC₅₀ de 4,5nM comparé à 2,5nM avec 9c-RA) mais restant incapable d'activer RAR α . Ce composé, le Ro11-1813 est donc complètement sélectif de RXR α (LeMotte P.K. et *al.*, 1996 a, b). En outre, ce même groupe dans une étude sur la différenciation de cellules HL-60 par des rétinoïdes sélectifs des RXRs, a utilisé des ligands de structure figée en configuration 9-*cis*. En effet, en introduisant un cycle à la place de la double liaison C₉-C₁₀ de la chaîne polyénique, la libre rotation de cette partie de la molécule est beaucoup moins aisée (ex. : Ro48-2250) conférant alors une forte sélectivité RXR (Apfel C.M. et *al.*, 1995). Des analogues structuraux de ligands portant un groupement *cis*-cyclopropyle élaborés par le groupe de Chandraratna confirment les capacités activatrices de ces molécules pour les RXRs et pas ou pratiquement pas les RARs (Vuligonda V. et *al.*, 1996). D'autres groupes comme celui de Chandraratna ont modifié des rétinoïdes stilbènes comme le TTNPB, agoniste spécifique des RARs, afin d'obtenir des analogues activateurs des RXRs (Beard R.L. et *al.*, 1994, 1995 a, Boehm M.F. et *al.*, 1994). Ils ont ainsi montré que le remplacement de la partie benzoïque du 3-méthyl-TTNPB (ligand panagoniste activant RAR et RXR) pour donner l'AGN191701 entraînait une sélectivité potentielle RXR (Beard R.L. et *al.*, 1995 b). Il reste néanmoins légèrement actif vis-à-vis de RAR α et RAR γ . De ce fait, par des substitutions appropriées, ils ont obtenu différents composés actifs avec les RXRs mais avec des degrés d'activité différents vis-à-vis des RARs.

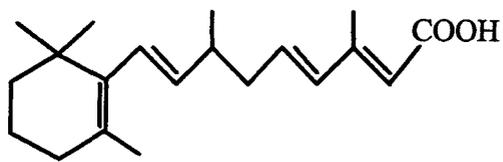
La seconde classe d'agonistes sélectifs des RXRs sont les acides dérivés benzophénocarboxyliques comme le SR11237, le SR11217 (Lehmann et *al.*, 1992) et le LGD1069 (ou Targretine : acide 4 (1-(3,5,5,8,8-pentaméthyl-5,5,7,8-tétrahydro-2-naphtyl) éthenyl) benzoïque) possédant un groupement 3 méthyle sur le cycle tétrahydronaphtalénique nécessaire à la spécificité et l'activité RXR (Boehm M.F. et *al.*, 1994 a, 1995 b). Ils sont

actuellement en essais cliniques de phase I/II A dans le traitement de cancers. Le LGD1069 semble particulièrement intéressant pour ses capacités antiprolifératives sur un grand nombre de modèles *in vitro* et *in vivo* en particulier sur le carcinome humain (Bischoff E.D. et *al.*, 1998). De plus, singulièrement, il peut induire directement la mort cellulaire programmée mais n'agit pas sur la différenciation des promyélocytes leucémiques humains (Miller V.A. et *al.*, 1997). Des études de tératogénicité sur des souris gravides, corrélées avec des études de l'inhibition de la chondrogenèse sur des ganglions lymphatiques embryonnaires de souris, de différents composés spécifiques des RARs ou des RXRs ont également été menées par Jiang H. et *al.* Ils montrent que les molécules SR11217 et SR11237 n'entraînent pratiquement pas d'effets tératogènes sur les souris alors que l'AGN191701 non tératogène à faible dose le devient légèrement à forte dose (Jiang H. et *al.*, 1995). (Ligands spécifiques des RXRs : fig 11).

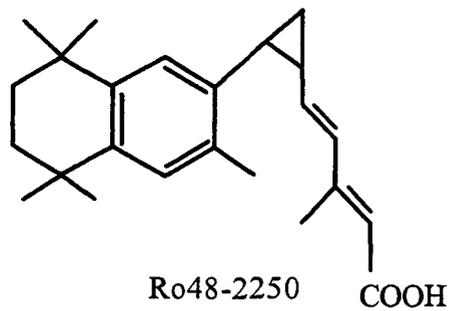
Compte tenu de la forte tératogénicité des rétinoïdes spécifiques des RARs, ces composés dérivés pourraient diminuer les effets indésirables liés aux utilisations thérapeutiques en dermatologie et en cancérologie.

3.2.2. Rétinoïdes antagonistes des RXRs

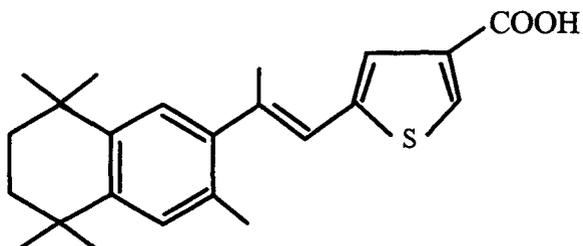
La molécule la plus intéressante est le LG100754 (acide 7-(3-propoxytétrahydrotétraméthylnaphtyl)-6-*cis*-octatriénoïque) (fig 12). Il possède une très forte affinité de liaison avec les RXRs (8 à 14 nM) et il inhibe totalement l'activation d'agonistes de RXR comme le LGD1069 (activité de transactivation 2 à 13 %) même si le récepteur est totalement saturé par le ligand agoniste. Cet analogue est donc un antagoniste de l'homodimère RXR. L'attribut structural de ce composé, nécessaire à l'activité antagoniste de l'homodimère RXR, dépend de la taille du groupement 3-alkoxy sur la partie tétrahydronaphtyle et de la nature géométrique de l'oléfine en C₆. Ainsi dans la série des acides 6-*cis* octatriénoïque, le substituant 3-méthoxy confère une activité agoniste, le substituant 3-éthoxy donne une activité d'agoniste partiel à la molécule alors que le groupement 3-propoxy induit une activité antagoniste (Canan Koch S.S. et *al.*, 1996).



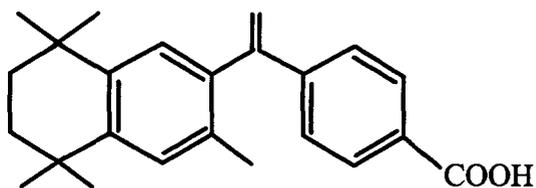
Ro11-1813



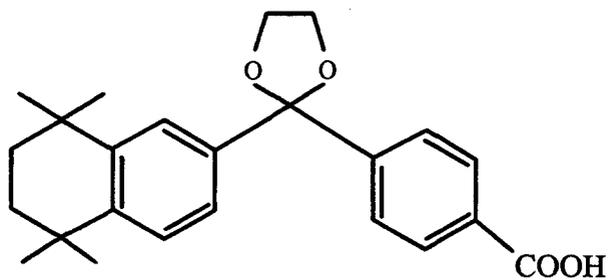
Ro48-2250



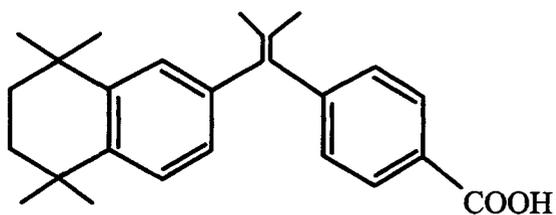
AGN191701



LGD1069 (Targretine)

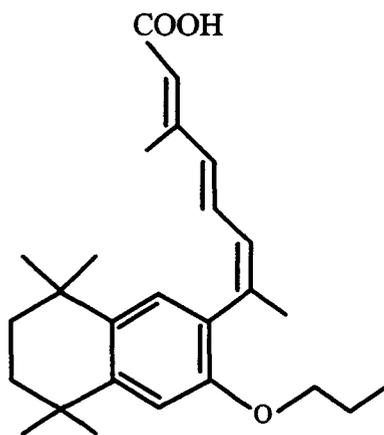


SR11237



SR11217

Fig. 11 : Ligands spécifiques de RXRs



LG100754

Fig. 12 : Ligand antagoniste de RXR (homodimère)

3.3. Ligands panagonistes des RARs et des RXRs

Il existe peu de rétinoïdes synthétiques pouvant lier aussi bien les RARs ou les RXRs. Le LE540 en est un premier exemple (Shudo K. et *al.*, 1993). Dans le but d'améliorer les propriétés thérapeutiques des rétinoïdes analogues de *t*-RA ou de 9*c*-RA, Zhang L. et *al.* ont substitué la partie β -ionone de *t*-RA et de 9*c*-RA avec des bioisostères lipophiles tels qu'un groupement dialkylphényle (de la même façon que Shudo K. et Kagechika H., 1990). Ils ont donc obtenu des analogues di-*tert*-butylphényle substitués possédant une activité biologique anticancéreuse (antiprolifération cellulaire) et une bonne stabilité chimique et métabolique. Le LG100567 qui présente un profil de ligand panagoniste (Zhang L. et *al.*, 1996) (K_i de 63,5nM pour RAR α comparé au K_i de 4,6nM pour RXR α et un même ordre de grandeur pour les autres sous-classes de récepteurs), possède également une activité antiproliférative très importante sur des cellules de carcinome cervical humain (ME180) (fig 13).

3.4. Rétinoïdes à activité anti AP-1

Les protéines AP-1 constituent la famille des facteurs de transcription regroupant les protéines Jun (c-Jun, Jun B et Jun D) et les protéines Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2 et Fos B2). Chacune de ces protéines est formée d'un motif "leucine zipper" leur permettant de former des homo- ou des hétérodimères. (Seules les protéines Jun sont capables de former des homodimères et de se lier à l'ADN). L'acide rétinoïque (Schüle R. et *al.*, 1991) et un certain nombre de rétinoïdes synthétiques en se liant aux RARs ou aux RXRs ont la capacité d'inhiber l'activation des protéines AP-1. Fanjul A. et *al.*, ont comparé 50 rétinoïdes synthétiques pour leur activité anti AP-1 en présence de RAR α , β , γ et RXR α (Fanjul A. et *al.*, 1994). Plusieurs rétinoïdes (tout comme *t*-RA) possèdent à la fois une activité transcriptionnelle et une activité anti AP-1 alors que certains rétinoïdes sont sélectifs d'une activité en fonction d'un récepteur donné. Par exemple, SR11105 (acide (E)-4-(2-(5,5-diméthyl-5,6,7,8-tétrahydro-3-naphtalényle)-propényle)benzoïque) est un rétinoïde sélectif de RAR γ/β en transactivation mais il est RAR α et RAR β sélectif pour son activité anti AP-1. De même, SR11217 (acide 4-(2-méthyl-1-(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtalényle)propényle)benzoïque) est un composé fortement sélectif de RXR α pour son activité transactivatrice alors qu'il devient RAR β sélectif pour l'activité anti AP-1. Il est désormais établi que les rétinoïdes dits sélectifs anti AP-1 ne peuvent pas réguler la

transcription génique par l'intermédiaire des RARs et des RXRs et donc n'induisent pas la différenciation des cellules F9 mais qu'ils permettent à ces récepteurs d'interférer avec les facteurs de transcription AP-1 et d'inhiber la prolifération cellulaire (tab. 3). De plus, une corrélation est également observée entre l'activité antagoniste en transactivation de certains rétinoïdes vis-à-vis de tel ou tel récepteur et l'activité anti AP-1 de ces composés avec les mêmes récepteurs. Ainsi, la molécule SR11302 inhibe la transcription en présence de RAR α et RAR γ (mais pas de RAR β) et possède une activité anti AP-1 avec RAR α et RAR γ mais pas avec RAR β . De ce fait, il est probable que le rétinoïde se fixe dans la même poche de liaison quel que soit la conséquence sur l'activité du récepteur. Cependant, les rétinoïdes spécifiques de l'activité anti AP-1 restent malgré tout des antagonistes faibles comparés aux antagonistes identifiés en tant que tels. Les mécanismes d'activation entraînent probablement des conformations différentes des récepteurs. L'acide rétinoïque qui possède une chaîne polyénique flexible est apparemment capable de s'accomoder aux deux conformations alors que les rétinoïdes spécifiques de l'une ou de l'autre activité présentent une structure plus rigide qui entraîne une conformation spécifique du récepteur. Cette corrélation entre les activités, antagoniste et anti AP-1, a également été observée pour d'autres rétinoïdes tels que BMS411 et BMS453. Cependant, ce n'est pas la condition exhaustive pour qu'un rétinoïde soit un puissant inducteur de l'activité anti AP-1. L'ALRT1550, par exemple (fig. 14), synthétisé à partir d'un acide di-tert-butyl benzoïque, est un composé rétinoïde sélectif des RARs qui possède, néanmoins, une très forte activité anti AP-1 (Zhang L. et *al.*, 1996). En conclusion, nous pouvons donc souligner que les composés sélectifs de l'activité anti AP-1 sont en général des inhibiteurs de lignées cancéreuses plus puissants que *t*-RA et plus spécialement à de faibles concentrations.

4. Applications thérapeutiques des rétinoïdes de synthèse

De nombreux rétinoïdes avec des affinités spécifiques et sélectives des différents RARs et RXRs ont été synthétisés dans le but de dissocier l'efficacité thérapeutique désirée de la tératogénicité.

4.1 Sélectivité des rétinoïdes et tératogénicité

Elmazar M.M.A. et *al.* se sont demandés s'il existait une corrélation entre la sélectivité pour la liaison et la transactivation par les RARs de différents rétinoïdes de

Rétinoïdes	Activité anti AP-1 (%) à 10 ⁻⁶ M	Sélectivité anti AP-1 à 10 ⁻⁶ M	Activité de transactivation (%) à 10 ⁻⁵ M	
<i>t</i> -RA		100	RAR α , β , γ	100
9 <i>c</i> -RA		100	RXR s	100
SR11238		> 81	RAR β > RAR γ > RXR α > RAR α	10 (RAR γ , RXR α)
SR11302		> 81	RAR α > RAR γ > RXR α = RAR β	0
SR11220		80-71	RAR α > RAR γ > RAR β > RXR α	< 20 (RAR γ , RAR α)
SR11327		80-71	RAR α > RAR β > RAR γ > RXR α	< 15
SR11228		70-61	RAR γ > RAR α > RXR α > RAR β	< 15 (RAR β , RAR γ)
SR11324		60-50	RXR α > RAR γ > RAR β > RAR α	< 20 (RAR γ , RAR β)
SR11235		< 22	RAR γ = RXR α > RAR β = RAR α	75 (RXR α)

Tab. 3 : Structures et activités anti AP-1 de rétinoïdes spécifiques (Fanjul A. et *al.*, 1994)

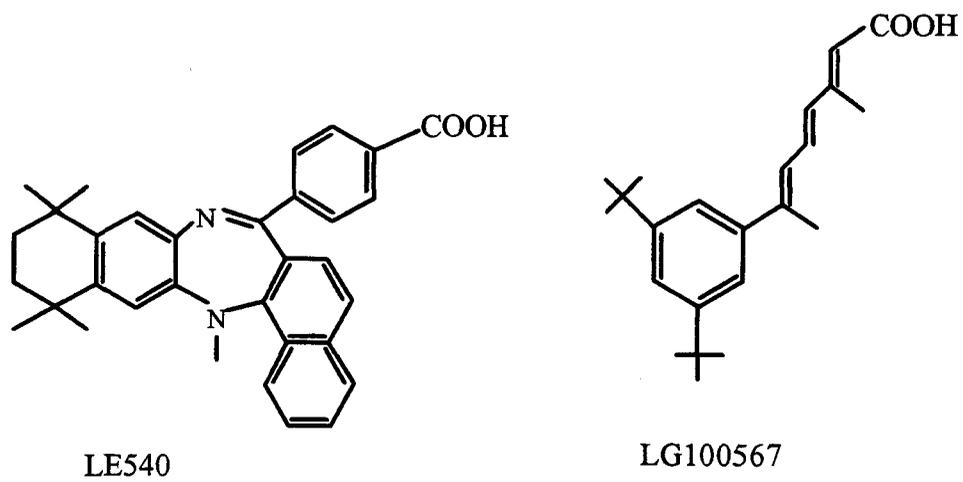


Fig. 13 : Ligands panagonistes

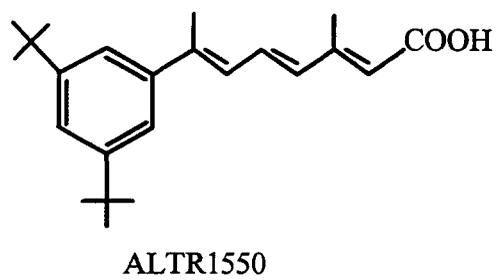


Fig. 14 : Un puissant ligand à activité anti AP-1

synthèse et leur pouvoir tératogène. Pour cela, ils ont administré différentes doses d'Am580 (ligand sélectif RAR α) ou de CD2019 (sélectif RAR β) ou de CD437 (sélectif RAR γ) à des souris gravides (Elmazar M.M.A. et *al.*, 1996). Ils ont constaté deux faits essentiels. Premièrement, l'Am580 est le plus puissant tératogène (voire plus tératogène que le *t*-RA), suivi du CD2019 puis du CD437. Or, ce classement est comparable aux affinités de liaison et de transactivation de ces trois rétinoïdes pour leur récepteur respectif suggérant alors une corrélation entre la tératogénicité et l'affinité de ces ligands. Cependant, cette hypothèse peut être controversée par le fait que les arétinoïdes qui ont une affinité de liaison similaire à celle de *t*-RA, induisent à de faibles concentrations des effets tératogènes importants (Crettaz M. et *al.*, 1990, Lehmann J.M. et *al.*, 1991). De plus, des paramètres pharmacocinétiques peuvent également entrer en ligne de compte. D'autre part, ces résultats peuvent être compatibles avec la distribution des récepteurs au cours de l'embryogenèse (RAR α est ubiquitairement exprimé alors que l'expression de RAR β et RAR γ est plus tardive et plus limitée) mais cela reste à démontrer. Des observations similaires ont été réalisées au cours d'une autre étude menée par Willhite C.C. et *al.*, néanmoins, ils ont constaté que la tératogénicité diminuait avec un ligand spécifique de RXR (Willhite C.C. et *al.*, 1996). Compte tenu de ces observations, il semble assez difficile de développer des rétinoïdes non tératogènes sélectifs. Cependant, RAR γ étant peu exprimé en dehors de la peau et des dérivés de l'ectoderme, la faible tératogénicité des ligands sélectifs de RAR γ permet, malgré tout, un champ plus large d'application thérapeutique.

4.2. Sélectivité des rétinoïdes et utilisation thérapeutique

Pendant longtemps, l'étude des effets de médicaments potentiels se faisait de façon indirecte. L'interaction entre le médicament et sa cible moléculaire n'était analysée que par quantification, soit d'une réponse, soit plus récemment de la compétition avec une sonde radioactive plus ou moins spécifique, sur un animal entier, un organisme ou un tissu isolé. Or, compte tenu de la méconnaissance de la structure réelle des cibles visées, la mise au point de nouvelles molécules actives n'était jamais rationnelle. Désormais, grâce au développement du clonage moléculaire des récepteurs, la pharmacologie classique est en pleine évolution. Ainsi, la connaissance détaillée de l'expression des récepteurs nucléaires peut faciliter le développement de nouvelles stratégies dans le traitement de cancers par des rétinoïdes sélectifs. Différentes études ont été effectuées dans ce but, par exemple sur des lignées cellulaires de carcinome de pancréas humain (Rosewicz S. et *al.*, 1995), sur des cellules de

carcinome squameux (Issing W.J. et Wustrow T.P.U., 1996), sur des cellules de cancer du sein (Li X. et al., 1995, Widschwendter M. et al., 1997), sur des cellules de la peau (Reichrath J. et al., 1997), etc. Comme dans la plupart des lignées cellulaires, les RARs et les RXRs sont exprimés, plusieurs études ont été réalisées en associant des ligands spécifiques et sélectifs des RARs avec des ligands agonistes des RXRs. Dans la majorité des cas, une synergie d'activation des deux types de ligands par l'intermédiaire des hétérodimères RAR/RXR est obtenue. Pour argumenter ces observations, plusieurs exemples peuvent être cités. Le traitement par l'association de ligands agonistes RAR α ou RAR β avec un agoniste RXR α , de cellules de neuroblastome, induit le développement de neurites supposant l'implication d'hétérodimères à RAR/RXR (Carpentier A. et al., 1997). L'inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose chez des cellules RA-résistantes de cancer du sein humain peuvent être provoquées par la combinaison de rétinoïdes RXRs-sélectifs avec des rétinoïdes RARs-sélectifs (Wu Q. et al., 1997). Une grande série de rétinoïdes agonistes sélectifs des trois classes de RARs ou des RXRs a également été testée sur des cellules de carcinome du poumon et il s'est avéré que certaines combinaisons de rétinoïdes sélectifs RARs/RXR optimisaient l'activité inhibitrice sur la croissance (Sun S-Y. et al., 1997). Pour dernier exemple, le même phénomène a été observé sur des cellules de carcinomes embryonnaires (P19) traitées par différentes combinaisons de ligands RARs et RXRs sélectifs. En fonction des ligands associés et de la concentration de chaque rétinoïde, il est possible d'obtenir une différenciation et une induction de l'apoptose optimales (Horn V. et al., 1996, Roy B. et al., 1995). Ainsi la combinaison spécifique de rétinoïdes synthétiques sélectifs peut élargir le champ d'utilisation thérapeutique des rétinoïdes en évitant les nombreux effets secondaires de l'acide rétinoïque.

De récentes études ont également pu mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation d'antagonistes en thérapeutique. L'AGN193109, ligand antagoniste des RARs, semble un antidote potentiel de l'intoxication induite par une surdose de rétinoïde *in vivo*. En effet, lorsque des souris femelles sont traitées par le TTNPB pendant cinq jours, il apparaît une desquamation de la peau et une splénomégalie. Ces effets peuvent être stoppés de façon dose dépendante par un cotraitement avec l'AGN193109 (Standeven A.M. et al., 1996). Cet antagoniste pourrait donc se trouver être un outil expérimental important dans l'élucidation de la biologie des rétinoïdes. En outre, l'utilisation d'antagonistes RAR α en association avec un agoniste RXR (SR11237) permet d'induire la différenciation de cellules APL NB4 avant apoptose, ainsi que l'expression de gènes cibles et la relocalisation de PML (protéine

promyélocytaire leucémique) (Chen J-Y. et *al.*, 1996). Il deviendrait donc possible d'initier un programme de gènes complexes par un choix approprié de combinaisons de rétinoïdes synthétiques avec des caractéristiques prédéfinies.

L'utilisation concomitante de multiples agents exerçant des mécanismes d'action différents représente également de nouvelles voies d'investigation. En effet, la combinaison d'un agent promoteur de différenciation, d'un agent antiprolifératif et d'un agent inducteur d'apoptose semble particulièrement appropriée au traitement de lésions pré-malignes. Plusieurs essais combinatoires sont actuellement en cours d'élaboration comme par exemple l'utilisation de 13-*cis* RA, du tamoxifène et de l'interféron β (Lama G. et *al.*, 1996, Recchia F. et *al.*, 1995) ou de rétinoïdes sélectifs de RAR γ en association avec l'interféron γ dans le traitement de cellules de cancer du sein humain (Widschwendter M. et *al.*, 1997).

L'activité antitumorale des rétinoïdes semble due aussi bien à l'induction de la transactivation qu'au blocage de l'activité AP-1. Le mécanisme d'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses est de plus en plus étudié en utilisant des rétinoïdes sélectifs de l'activité anti AP-1 seuls (Soprano D.R. et *al.*, 1996, Giannini G. et *al.*, 1997) ou en présence d'interférons avec lesquels une action synergique peut être observée (Fanjul A. et *al.*, 1996). Récemment, Huang C. et *al.*, ont réalisé la première expérience *in vivo* sur des souris, en utilisant les composés SR11235 (de faible activité anti AP-1) et SR11302 (puissant anti AP-1), mettant en évidence que l'effet antitumorale des rétinoïdes résulte du blocage de l'activité AP-1 mais pas de l'activation de la transcription sur un élément de réponse RARE (Huang C. et *al.*, 1997). Cependant, il apparaît que sur les cellules leucémiques ou sur les cellules de neuroblastome, l'action antiproliférative des rétinoïdes ne s'effectue pas par l'inhibition de la voie AP-1 mais plutôt grâce à la voie de transactivation par les RARs/RXRs sur les éléments de réponse correspondants (Kizaki M. et *al.*, 1996, Giannini G. et *al.*, 1997). Il existerait donc deux mécanismes distincts entraînant un effet antiprolifératif qui seraient dépendants du type cellulaire en présence.

En conclusion, un progrès considérable a été effectué dans la compréhension du mécanisme d'action des rétinoïdes et dans l'élaboration de ligands rétinoïdes de synthèse, permettant ainsi une induction d'effets biologiques spécifiques et par conséquent, des applications thérapeutiques mieux dirigées avec le moins d'effets secondaires possibles. Cependant, la sélectivité de liaison observée de certains ligands de synthèse pour RAR α ,

RAR β ou RAR γ ainsi que la différence d'affinité de liaison de *t*-RA et de 9*c*-RA pour les 3 RARs, indiquent que malgré une homologie de séquence de 80% entre les domaines de liaison des 3 RARs, il existe des différences faibles mais essentielles au niveau de ces sites de liaison qui caractérisent des déterminants spécifiques de liaison de chacune de ces sous-classes de récepteurs.

Chap. II :

Mécanismes de la

signalisation

induite par les

rétinoïdes

I. Les récepteurs nucléaires

1. Généralités

Les hormones stéroïdiennes, les hormones thyroïdiennes, les rétinoïdes et la vitamine D sont de petites molécules hydrophobes très différentes les unes des autres, aussi bien dans leur structure que dans leur fonction. Néanmoins, leur mécanisme d'action est similaire. Elles diffusent directement à travers la membrane plasmique des cellules cibles et se fixent sur des récepteurs protéiques intracellulaires. La fixation du ligand active les récepteurs qui, ensuite, contrôlent directement la transcription de gènes spécifiques. Ces récepteurs sont structurellement proches et constituent une superfamille de récepteurs intracellulaires (ou superfamille des récepteurs nucléaires). Les récepteurs intracellulaires se fixent tous sur des séquences spécifiques de l'ADN, adjacentes aux gènes que leurs ligands contrôlent. Quelques-uns d'entre eux, comme le récepteur du cortisol, sont localisés principalement dans le cytosol et se lient à l'ADN après activation par le ligand ; les autres récepteurs, tels que les récepteurs des rétinoïdes sont déjà localisés dans le noyau lors de la liaison du ligand. Dans tous les cas, la fixation du ligand induit une modification de la conformation du récepteur, qui ensuite active (ou occasionnellement réprime) la transcription. Dans la plupart des cas, la réponse au ligand s'effectue en deux étapes : l'induction directe de la transcription d'un petit nombre de gènes spécifiques survient en 30 minutes et constitue la réponse primaire ; les produits de ces gènes activent à leur tour d'autres gènes constituant la réponse secondaire retardée. Ainsi, une simple stimulation hormonale peut engendrer un changement très complexe du mode d'expression des gènes.

2. Aspect historique

La découverte de la fonction de facteurs de transcription des récepteurs stéroïdiens est venue de l'analyse de la métamorphose des insectes. En effet, l'ecdysone induit des "boursouflures" sur les chromosomes polytènes au niveau des glandes salivaires d'insecte montrant ainsi une relation directe entre l'action des stéroïdes et l'activation génique (Becker H.J., 1959, Clever U. et Karlson P., 1960). Finalement, avec le clonage de l'ADNc du récepteur de l'ecdysone, il apparaissait évident d'établir une corrélation entre ce récepteur et les récepteurs stéroïdiens des vertébrés (Koelle M.R. et *al.*, 1991). Le premier facteur de

transcription à avoir été isolé et étudié en détail est le récepteur des glucocorticoïdes (Hollenberg S.M. *et al.*, 1985).

3. Organisation générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont organisés en six domaines notés de A à F (fig. 15) (parfois seulement cinq) (pour revue : Evans R.M., 1988, Green S; et Chambon P.,1988). Deux de ces domaines, le domaine C et le domaine E, sont conservés chez pratiquement tous les membres de la superfamille. L'importance de la conservation de ces domaines est le reflet de leurs fonctions essentielles. Le domaine N-terminal A/B est impliqué dans la transactivation grâce à la région AF-1 qui agit indépendamment de la fixation du ligand. La partie C-terminale de ce domaine A/B proche du domaine C de liaison à l'ADN peut jouer un rôle dans l'interaction avec l'ADN en régulant la capacité du récepteur à interagir avec d'autres membres de la famille ou en modifiant le choix de la séquence cible de l'ADN. Le domaine C, formé de deux structures en doigt de zinc, est responsable de l'activité de liaison à l'ADN du récepteur. Le domaine D est une région charnière, flexible, entre le domaine C et le domaine E et en général, abrite les signaux de localisation nucléaire. Cette région contient les boîtes T (de dimérisation) et A (de reconnaissance de l'ADN) qui sont hautement conservées. Finalement, le domaine E/F est important pour la liaison au ligand, la dimérisation et la transactivation. Il contient en particulier la région AF-2 dont l'activité dépend de la fixation du ligand. De plus, il est reconnu par des facteurs coactivateurs ou corépresseurs au niveau de la machinerie transcriptionnelle.

4. Evolution de la superfamille des récepteurs nucléaires

L'organisation modulaire de ces récepteurs nucléaires, les différents degrés de conservation de séquence entre leurs domaines respectifs (fig. 16) et leur rôle important dans de nombreux processus biologiques ont conduit différents auteurs à étudier l'évolution de ces molécules (Amero S.A. *et al.*, 1992, Laudet V. et Stéhelin D., 1992). D'une façon générale, une classification divisant la famille des récepteurs nucléaires en trois sous-familles a été établie. La première sous-famille comprend les TRs, les RARs, les PPARs, les VDRs, les GRs, les PRs, les ERs et le EcRs. La seconde contient RXRs, HNF-4 et COUP-TF et la troisième regroupe les récepteurs orphelins comme ERR1 et ERR2. Cette classification est

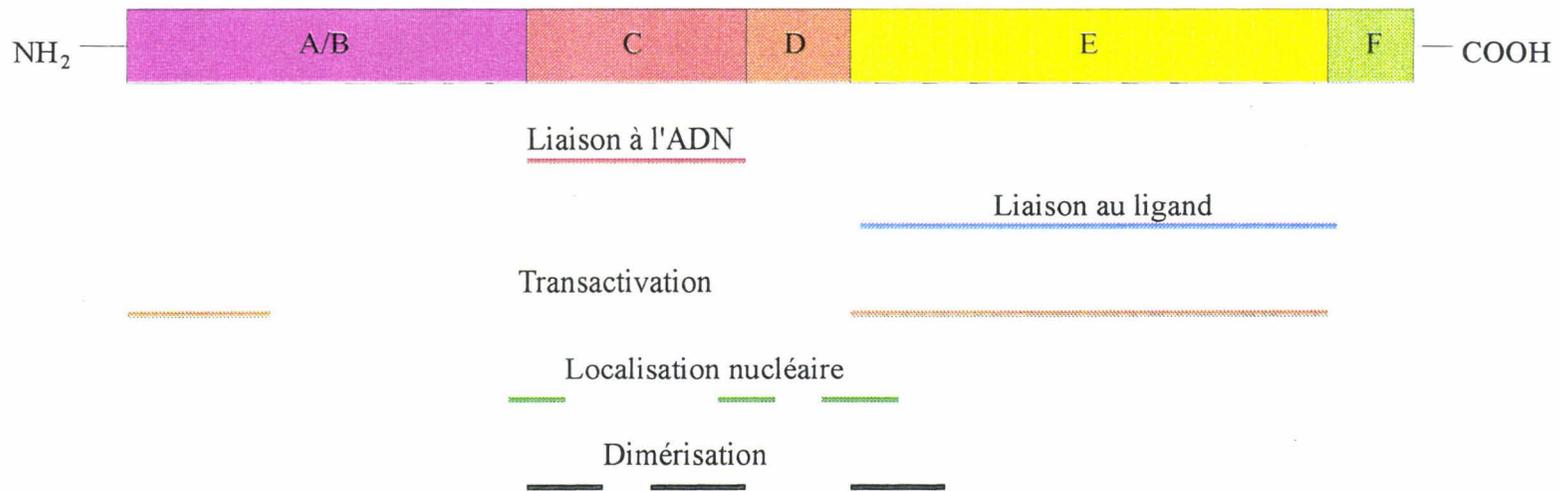


Fig 15 : organisation générale des récepteurs nucléaires



Fig 16 : comparaison d'homologies de séquences entre les membres de la famille des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf D.J., 1994)

basée sur les fonctions de liaison à l'ADN et de dimérisation des récepteurs nucléaires (fig. 17).

II. Les récepteurs de l'acide rétinoïque

1. Découverte des récepteurs de l'acide rétinoïque

Le mécanisme d'action des rétinoïdes est longtemps resté inconnu. La découverte, dans les années 1970, de la protéine cellulaire cytoplasmique de liaison de *t*-RA, la CRABP (Ong D.E. et Chytil F., 1978) laissait supposer que cette protéine était le véritable récepteur de *t*-RA. Cependant, le rôle des CRABPs dans la régulation de la transcription par le *t*-RA n'était pas défini. Dans certaines cellules, par exemple, la présence de CRABPs ne semblait pas nécessaire à l'obtention d'une réponse induite par *t*-RA (Haussler M.R. et *al.*, 1984). Il s'avère de plus, que les CRABPs ne présentent pas d'homologie structurale ou de ressemblance au cours de l'évolution avec les récepteurs des hormones stéroïdiennes ou tout autre classe de protéines régulatrices connues. Ajouté à ceci, elles ne se localisent pas dans le noyau et sont incapables de lier l'ADN. Toutes ces propriétés associées ont réfuté l'hypothèse que ces protéines soient les véritables récepteurs de l'acide rétinoïque. En 1987, Giguère et *al.*, et Petkovitch et *al.*, indépendamment, isolèrent un ADNc d'un récepteur humain codant pour le premier facteur de transcription activé par l'acide rétinoïque (Giguère V. et *al.*, 1987, Petkovitch et *al.*, 1987). Ce récepteur humain de l'acide rétinoïque (hRAR α 1) présentait un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand conservés au niveau structural et fonctionnel avec d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il était, en outre, capable d'activer la transcription de gènes cibles à des concentrations de *t*-RA efficaces *in vivo*. La découverte de ce RAR était essentielle à la compréhension à l'action de *t*-RA. Par la suite, d'autres ADNc apparentés à celui du RAR ont été identifiés et actuellement, il existe trois sous-classes de RARs : RAR α , RAR β et RAR γ (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1994). En 1990, une autre catégorie de récepteurs répondant au signal de l'acide rétinoïque a été découverte : la seconde classe de facteurs de transcription de rétinoïdes, les récepteurs X des rétinoïdes (hRXR α) (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1990). Trois sous-classes de RXRs : RXR α , β et γ sont également connus.

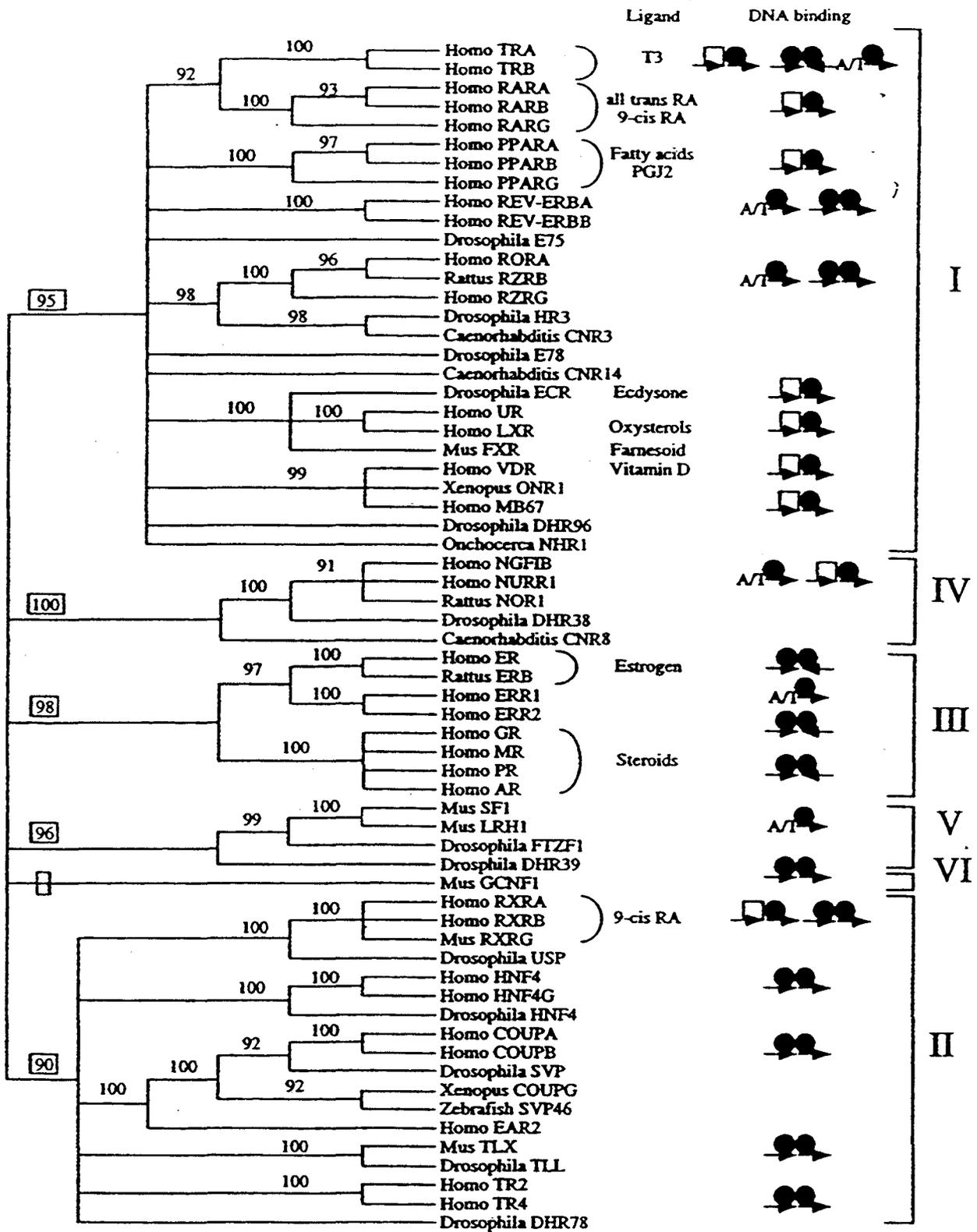


Fig. 17 : Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires (Laudet V., 1997)

2. Les RARs et les RXRs

2.1. Les RARs : structure, isoformes et distribution tissulaire

Les RARs sont composés de trois sous-classes : RAR α (Petkovitch M. et *al.*, 1987, Giguère V. et *al.*, 1987), RAR β (Brand N. et *al.*, 1988) et RAR γ (Krust A. et *al.*, 1989, Ishikawa T. et *al.*, 1990). Ces récepteurs sont retrouvés chez l'Homme, les rongeurs ainsi que chez les oiseaux et les amphibiens. Les RARs humains présentent de grandes homologies de séquence dans leur domaine de liaison à l'ADN et dans leur domaine de liaison au ligand. Les domaines de liaison à l'ADN de RAR α , β et γ ont approximativement 97% de leurs acides aminés conservés et les domaines de liaison au ligand, environ 80% (fig 18). Les régions aux extrémités amino-terminale (A/B) et carboxy-terminale (F) possèdent quelques homologies entre elles. Ces récepteurs ont également été conservés au cours de l'évolution au travers de différentes espèces, confirmant le rôle essentiel de la voie de signalisation des rétinoïdes. Par exemple, il y a conservation approximativement de 100% entre les domaines A/B et F de l'Homme et de la souris. Chaque sous-classe de RARs possède elle-même diverses isoformes qui proviennent de l'existence de deux promoteurs et d'un épissage alternatif (fig 19). Deux isoformes majeures sont retrouvées pour RAR α et RAR γ , et quatre isoformes pour RAR β (Zelen A. et *al.*, 1989, 1992, Leroy P. et *al.*, 1991, Nagpal S. et *al.*, 1992) (tab. 4). Les isoformes des RARs peuvent être classées selon leur promoteur d'initiation de la transcription P1 ou P2. RAR α 1, β 1, β 3 et γ 1 appartiennent à la classe 1 dépendante de P1 et la classe 2 regroupe RAR α 2, β 2, β 4 et γ 2. Ces isoformes sont fortement conservées parmi les espèces et présentent une expression et une distribution tissulaire spécifique au cours du développement (Dollé P. et *al.*, 1989, Ruberte E et *al.*, 1991). L'ARNm de RAR α est largement retrouvé dans la plupart des tissus alors que l'expression de l'ARNm de RAR β et de RAR γ est beaucoup plus spécifique de certains tissus. L'ARNm de RAR β est faiblement exprimé excepté au niveau du cerveau, du coeur, du poumon et des organes reproducteurs mâles. Il est absent de la rate et des intestins. L'ARNm de RAR γ est très abondant dans les tissus de l'épiderme et particulièrement l'ARNm RAR γ 1 (Kastner P. et *al.*, 1990). L'ARNm RAR γ 2 jouerait plutôt un rôle au cours de la morphogénèse (Crawford M.J. et *al.*, 1995). L'ARNm RAR peut être détecté très tôt au cours du développement embryonnaire. RAR α est exprimé dans les oocytes de souris, au stade morula et au stade blastocyste. Par contre, l'ARNm RAR β est retrouvé seulement à partir du stade morula et l'ARNm RAR γ au stade blastocyste.

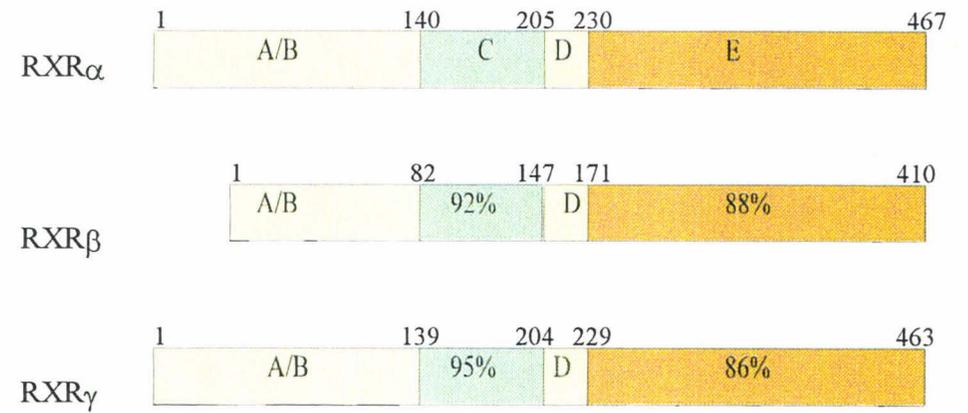
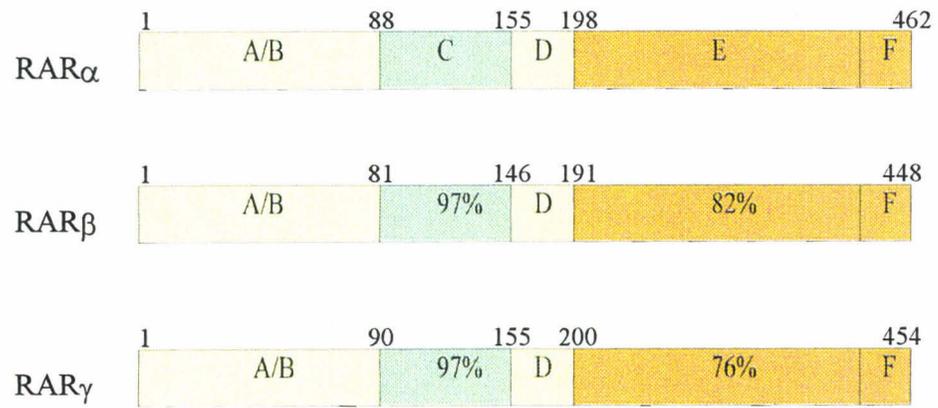


Fig. 18 : homologies de séquences entre les sous-classes des RARs et des RXRs (Mangelsdorf D.J., 1994)

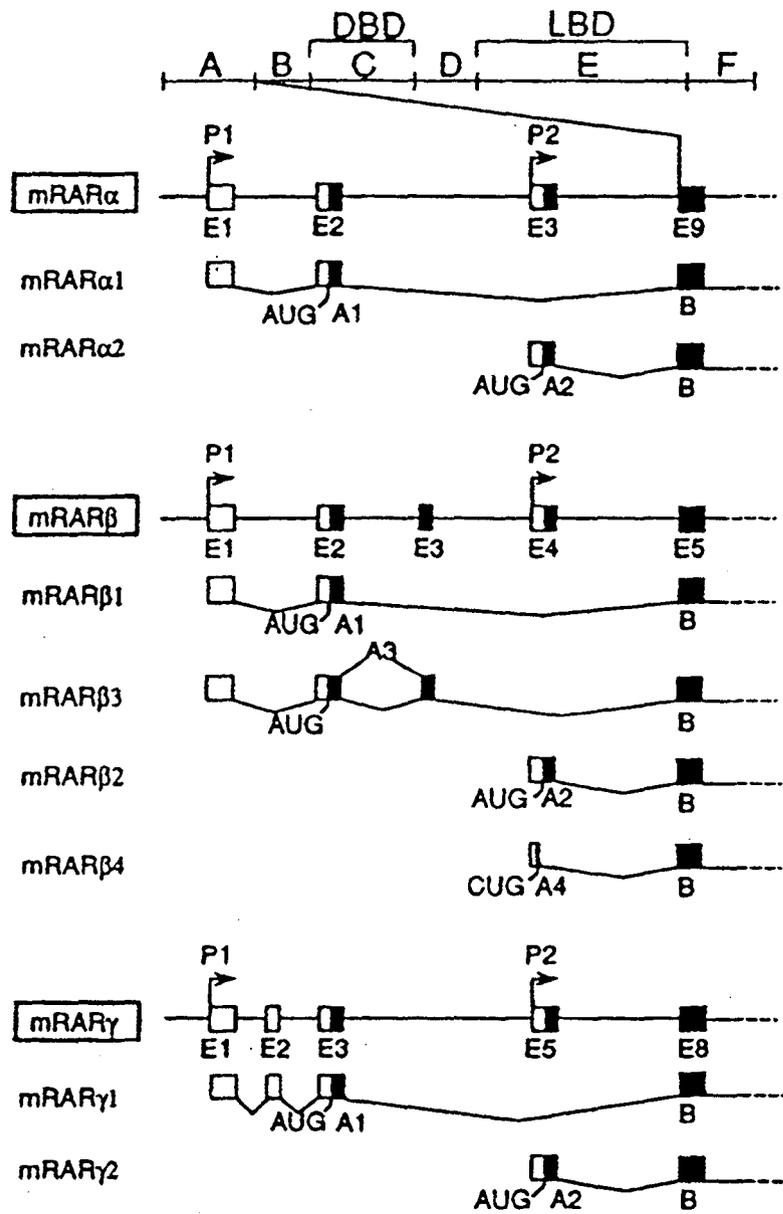


Fig. 19 : Isoformes de RAR α , β et γ (Leid M. et *al.*, 1993)

Gène	Isoformes	Localisation chromosomique		Expression tissulaire
		Humain	Souris	
RAR α	$\alpha 1, \alpha 2$	17q21.1	11	Abondant dans tous les tissus
RAR β	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$	3p24	14	Cerveau, foie, rein, coeur, poumon
RAR γ	$\gamma 1, \gamma 2$	12q13	15	Peau, poumon
RXR α	$\alpha 1, \alpha 2$	9q34.3	2	Abondant dans le foie, rein, muscle, rate
RXR β	$\beta 1, \beta 2$	6p21.3	17	Abondant dans tous les tissus sauf foie, intestin, testicules
RXR γ	$\gamma 1, \gamma 2$	1q22-q23	1	Muscle, coeur, foie, rein, glande surrénale, cerveau

Tab. 4 : Isoformes, localisation chromosomique et expression tissulaire des RARs et RXRs

La présence constante de l'ARNm RAR α au cours du développement indique que le gène de RAR α est essentiel au maintien de la voie biologique des rétinoïdes. L'expression disparate mais spécifique de RAR β et RAR γ suggère qu'elle est régulée par le développement.

2.2 Les RXRs : structure, isoformes et distribution tissulaire

Comme les RARs, la classe des RXRs est formée de trois sous-classes : RXR α , RXR β et RXR γ (Mangelsdorf D.J. et al., 1991 b). Ces trois RXRs lient le 9c-RA avec une forte affinité mais pas le t-RA (Heyman R.A. et al., 1992, Levin A.A. et al., 1992). Au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires, les RXRs ont comme plus proches parents, le produit du gène *ultraspiracle* de la drosophile (Oro A.E. et al., 1990) et la famille des récepteurs orphelins COUP-TF (Wang L.H. et al., 1989). Comme le produit du gène *ultraspiracle* est un homologue de RXR et qu'aucun homologue de RAR n'a été trouvé chez la drosophile, il en résulte que les gènes ancestraux de RXR sont plus anciens que ceux de RAR. Ces récepteurs sont présents chez l'Homme, la souris, la grenouille et le poulet.

La séquence primaire de ces trois RXRs peut également être divisée en régions, soit cinq domaines de A à E, le domaine F étant absent. Comparés entre eux, le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand de chaque RXR montre une très grande homologie de séquence, 93% et 88% respectivement (fig 18). Cependant, les RARs et les RXRs ne possèdent que 55 à 60% d'homologie de séquence pour le domaine de liaison à l'ADN et seulement 25% pour le domaine de liaison au ligand (Mangelsdorf D.J. et al., 1991). Il existe également des isoformes des sous-classes de RXRs possédant des propriétés de transactivation différentes (Barger P.M. et Kelly D.P., 1997).

L'expression de l'ARNm RXR α est spécifique du foie (organe stockant le rétinol), mais elle est également abondante dans le rein, le poumon, la rate et le muscle. Par contre, elle est faible dans la glande surrénale, le cerveau, le coeur, l'intestin et les testicules. L'ARNm RXR β est retrouvé en grande quantité dans de nombreux tissus excepté dans le foie, l'intestin et les testicules où il est faiblement exprimé. Comparé à RXR α et RXR β , l'ARNm RXR γ est le moins répandu et le moins exprimé. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation absolue entre les RARs et les RXRs, certaines similitudes peuvent néanmoins être relevées. Par exemple, RAR α et RXR β sont retrouvés dans la plupart des tissus alors que la distribution de RAR β , RAR γ , RXR α et RXR γ est plus réduite. De plus, RAR β et RXR γ sont exprimés dans

les motoneurones de la corde spinale, suggérant une parité sélective entre ces deux systèmes de récepteurs. En outre, l'épiderme humain adulte et les kératinocytes expriment l'ARNm RXR α , en quantité plus faible que l'ARNm RXR β mais pas l'ARNm RXR γ , alors que l'expression de RAR γ est spécifique de la peau. Ces observations suggèrent donc un rôle combiné et potentiellement interactif entre RXR α et RAR γ dans la morphogénèse de la peau humaine. Au cours de l'embryogénèse, l'ARNm RXR apparaît tardivement au 10^{ème} jour, alors qu'à ce même stade, les gènes des trois RARs sont différenciés et possèdent déjà une expression différentielle.

III. Le domaine de liaison au ligand

Le domaine responsable de la liaison du ligand est localisé dans la partie C-terminale des récepteurs nucléaires et comprend environ 250 acides aminés. Les domaines E des RARs et les RXRs présentent de forts degrés d'homologie entre chaque sous-classe mais pas entre les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens/thyroïdiens pour lesquels le degré d'homologie de séquence est nettement plus faible. Ceci est dû en grande partie à la diversité des ligands reconnus spécifiquement par chacun d'eux. Au début des années 1990, la structure du domaine E des récepteurs nucléaires étant encore peu connue, il est découpé, de façon simplifiée, en quatre régions : L1, Ti, DM et L2 (Forman B.M. et Samuels H.H., 1990). La région L1 située à l'extrémité N-terminale est directement impliquée dans la fixation du ligand et diffère beaucoup d'un récepteur à l'autre. La région Ti est responsable de la régulation de la transcription de façon ligand-dépendante et de l'interaction avec certaines protéines, comme les protéines de choc thermique (hsp), elle correspond à l'AF-2. Avec le domaine de dimérisation (DM), le domaine Ti est conservé. Cette surface de dimérisation est composée de neuf motifs de sept acides aminés ("Heptade repeat"). La région L2, C-terminale, est responsable de la fixation du ligand. Aujourd'hui, d'énormes progrès ont été réalisés avec la cristallographie.

Pour comprendre le mécanisme d'interaction récepteurs-ligands, il était nécessaire de connaître la structure et la conformation de ce site de liaison. Le premier modèle de structure tertiaire a été réalisé sur le domaine de liaison au ligand du récepteur thyroïdien β 1 (Mc. Phie P. et *al.*, 1993, Cheng S-Y. et *al.*, 1994). La structure secondaire du domaine E a été établie sur différents mutants par dichroïsme circulaire. Elle présente de larges zones en hélices α et en feuillets β , conduisant les auteurs à l'hypothèse que le domaine E de TR avait une

structure tertiaire en huit domaines organisée sous la forme d'un tonneau α/β . Ils ont également noté que la fixation de la 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T_3) induisait un changement de conformation de ce domaine. En 1995, une avancée considérable a été réalisée par l'obtention des données cristallographiques des domaines de liaison de l'apoRXR α (Bourguet W. et *al.*, 1995), de l'holoRAR γ (Renaud J.P. et *al.*, 1995) et de l'holoTR α 1 (Wagner R.L. et *al.*, 1995), rejetant le modèle en tonneau α/β .

1. Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand de hRXR α

Le domaine de liaison de RXR α (fig. 20) est une poche hydrophobe formée de 12 hélices α (représentant 65% du domaine) organisée en une structure antiparallèle de trois couches. Les hélices H4, H5, H8, H9 et la partie N-terminale de H11 sont en position centrale. Elles sont prises en "sandwich" entre les hélices H1, H2 et H3 d'une part et les hélices H6, H7 et H10 d'autre part. Deux courts feuillets β (s1 et s2), insérés entre H2 et H3 forment un coude en épingle à cheveux et sont les seules structures β du domaine. Deux cavités hydrophobes A et B sont des sites putatifs de liaison de 9 c -RA. Elles sont localisées près du coude s1-s2 et sont séparées par H5 dans laquelle Phe 313 et Leu 309, deux acides aminés essentiels, participent directement à la formation de ces sites. La poche A formée de s1, s2, H1, H3, H5 et de la partie N-terminale de H11, est accessible au solvant. Par contre, la poche B est une cavité plus allongée et hydrophobe. Elle est constituée de H5, s1, s2, H7 et de la région C-terminale de H10 avec l'extrémité N-terminale de H11. Bien que la protéine de liaison de l'acide rétinoïque de l'épididyme lie préférentiellement le t -RA au niveau d'une cavité large et profonde formée de feuillets β , d'une séquence proche de celle de RXR α notamment par la présence de 4 acides aminés aromatiques entourant le cycle β -ionone de l'acide rétinoïque ; la poche B semblait la plus propice à fixer le ligand. Cette idée paraissait confirmée par les expériences réalisées grâce à des ligands marqués ou par mutagenèse dirigée sur les récepteurs stéroïdiens (ER, PR, GR) (Reese J.C. et *al.*, 1992, Carlstedt-Duke J. et *al.*, 1988, Strömstedt P.E. et *al.*, 1990). Cependant, cette hypothèse est infirmée par le modèle cristallographique du domaine E de RAR γ lié à t -RA.

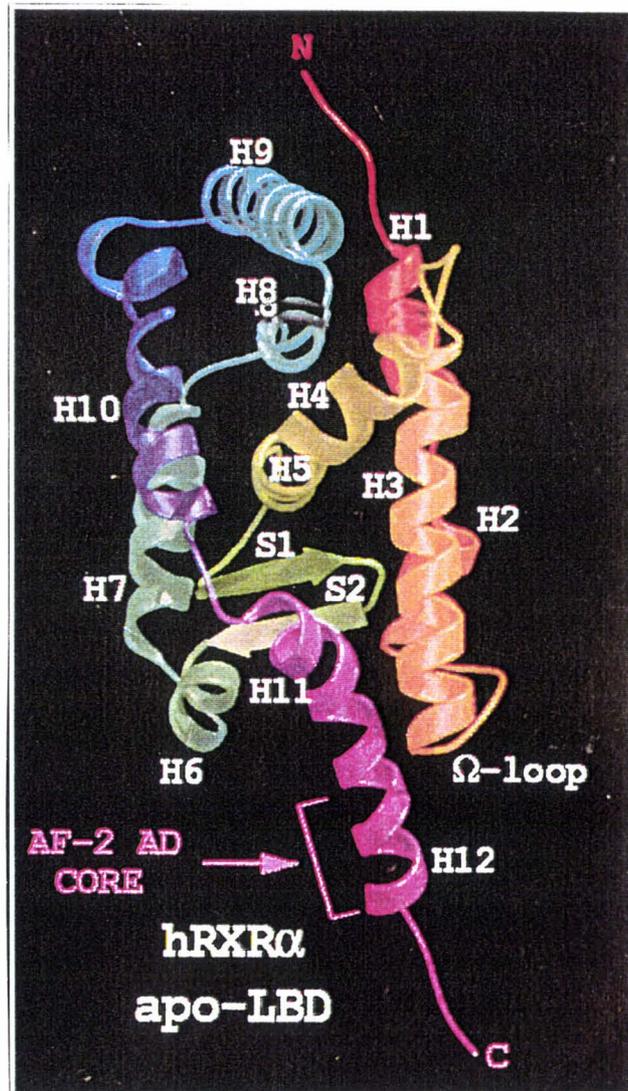


Fig. 20 : Structure cristallographique de l'apo LBD-RXR α (Bourguet W. et *al.*, 1995)

2. Le domaine E des RARs en présence d'un ligand

2.1. Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand de hRAR γ

Après avoir obtenu la structure cristallographique du domaine E de l'apoRXR α , le groupe de Chambon a établi la structure du domaine E de RAR γ lié à son ligand naturel, le *t*-RA (Renaud J.P. et *al.*, 1995) (fig. 21). De cette façon, les auteurs ont montré que non seulement la conformation des poches de liaison de RAR γ et de RXR α sont très proches mais qu'il existe un mécanisme générant un récepteur transcriptionnellement actif grâce à la liaison du ligand (fig. 22). Le domaine E de hRAR γ forme, de la même manière que le domaine E de RXR α une structure en trois couches constituée de 11 hélices α antiparallèles et de deux feuillets β . De petites différences peuvent cependant être relevées, comme par exemple, l'absence de l'hélice 2 et l'aspect plus compact du LBD-holo-hRAR γ par rapport à l'apoRXR α . Cette structure plus compacte est due à la liaison du ligand qui entraîne une réorganisation spatiale de certaines parties du domaine et en particulier le positionnement de l'hélice 12. (Le domaine de liaison au ligand de hRAR γ est composé de 11 hélices mais comme le modèle de base est celui du LBD-hRXR α et que l'hélice 2 est absente du LBD-hRAR γ , la numérotation des hélices se fait de 1 à 12). Le *t*-RA est enfoui dans une poche hydrophobe (LBP) formée par les résidus localisés dans H1, H3, H5, le coude β , la boucle 6-7, H11, la boucle 11-12 et H12. Cette poche correspond essentiellement à la cavité putative (A) de liaison de RXR α avec cependant le cycle β -ionone de *t*-RA au niveau de la cavité B, fermée par les hélices H11 et H12. Le groupement carboxylique de *t*-RA pénètre en premier dans le site de liaison créant une liaison faible avec la lysine 267 de H4. Il est ainsi guidé à l'intérieur de la poche grâce aux acides aminés chargés des hélices 3 et 5 (Lys229, Lys236, Lys240, Arg274 et Arg278). Ensuite, l'hélice 11 poussée par le ligand se positionne dans la continuité de H10 et fait pivoter H12. Il y a alors formation de la boucle Ω qui se place dans la continuité de H3, sous H6. H12 referme alors la cavité en formant des liaisons salines entre Glu414, Glu417 de H12 et Lys267 de H4. Ce mécanisme est comparé à celui de la "trappe à souris". Aucune de ces différences intrinsèques entre les deux structures LBD RAR γ et RXR α n'est visible mais ces deux modèles permettent d'observer deux états de conformation, apo et holo, pour le domaine de liaison et de déduire un modèle dynamique de la liaison du ligand. Ce changement de conformation induit par la fixation du ligand a également été quelque peu

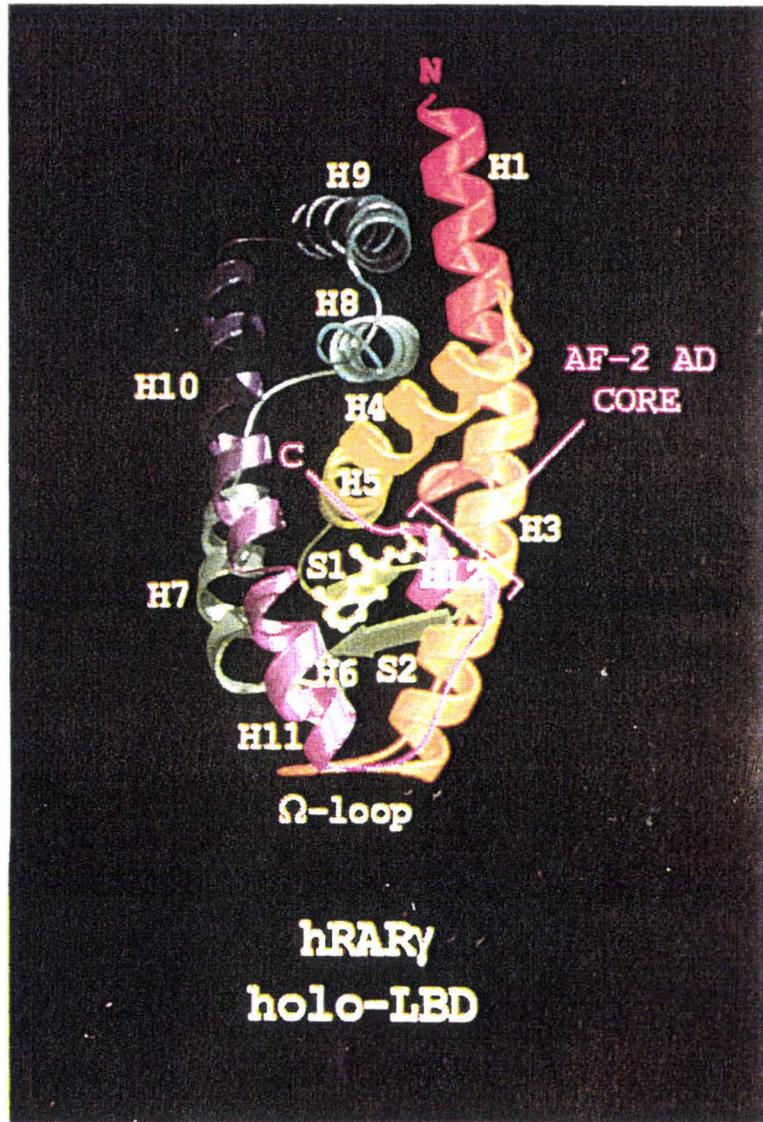


Fig. 21 : Structure cristallographique de l'holo LBD-RAR γ (Renaud J.P. et *al.*, 1995)

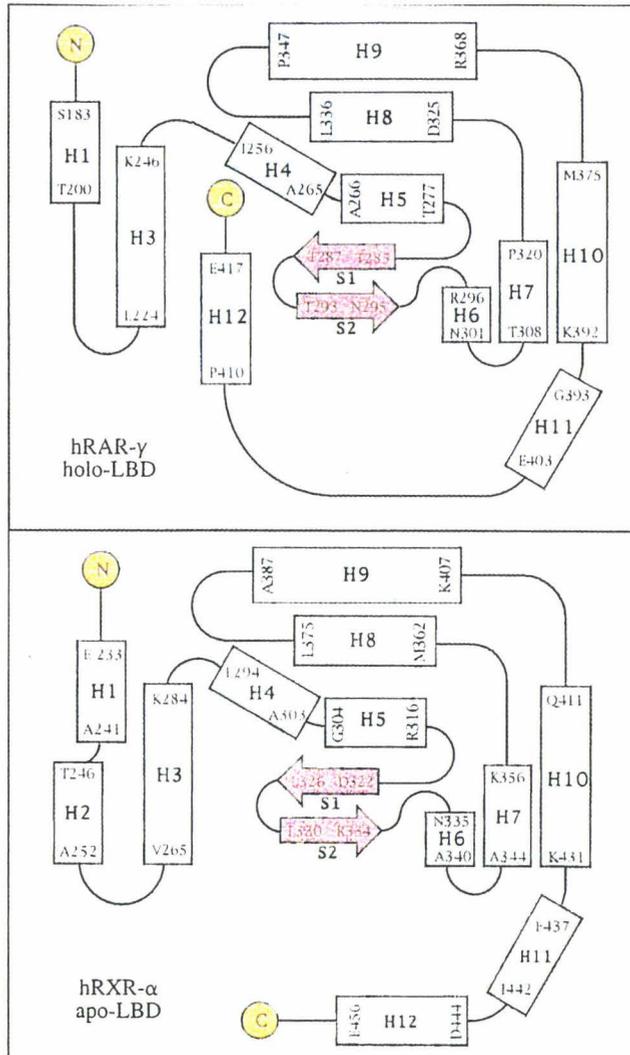


Fig. 22 : Représentation schématique des domaines de liaison de hRXR α et de hRAR γ (Renaud J.P. et al., 1995)

approché par l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre des épitopes de conformation de RAR γ (Driscoll J.E. et *al.*, 1996). Un des anticorps reconnaît spécifiquement la boucle Ω 207-222 de l'apo-récepteur. Lorsque le *t*-RA se fixe, cette boucle qui est proche de l'hélice 12, stabilise le site de liaison et facilite l'interaction entre l'AF-2 situé en H12 et la machinerie transcriptionnelle. De cette façon, les acides aminés formant la boucle Ω ne sont plus accessibles à l'anticorps qui se dissocie du récepteur. Deux autres anticorps reconnaissent la région N-terminale du domaine D (156 à 188) ainsi que la région C-terminale du domaine E (354-421) lorsque le récepteur est sous sa forme native. Si RAR γ est dénaturé, ces anticorps ne reconnaissent plus ces épitopes. Ceci confirme la proximité de ces deux régions, H1 et H9, dans la structure tridimensionnelle.

Selon Wurtz et *al.*, en se basant sur les structures de l'apoRXR α et de l'holoRAR γ et en réalisant des alignements de séquences des domaines de liaison de tous les récepteurs nucléaires (fig. 23), ces modèles conformationnels du mécanisme de liaison et d'activation peuvent être étendus à tous les récepteurs nucléaires (Wurtz et *al.*, 1996). Cette hypothèse a été d'une part appliquée pour établir la structure tridimensionnelle du récepteur des oestrogènes α (Wutrz J.M. et *al.*, 1998) et définir la région responsable de la reconnaissance différentielle des ligands du récepteur des androgènes et du récepteur de la progestérone (Vivat V. et *al.*, 1997 a). D'autre part, elle a été en partie vérifiée par la structure cristallographique du domaine de liaison du récepteur des hormones thyroïdiennes $\alpha 1$ de rat en présence d'une hormone thyroïdienne agoniste (isostère de T₃) (Wagner R.L. et *al.*, 1995). Ce domaine de liaison est formé de 12 hélices antiparallèles et de 4 feuillets β arrangés en trois couches. Comme l'holoRAR γ , l'holoTR $\alpha 1$ est plus compact que l'apoRXR α et l'hélice 11 est repliée vers l'intérieur du site en fermant la poche hydrophobe. Ces observations confirment le mécanisme de changement de conformation induit par la fixation du ligand. Aujourd'hui, la structure cristallographique du domaine de liaison de ER (Brzozowski M.M. et *al.*, 1997) et de PR (Williams S.P. et Sigler P.B., 1998) est également connue et les données comparées de ces deux récepteurs (Tanenbaum D.M. et *al.*, 1998) confirment l'hypothèse d'une structure type caractéristique de tous les récepteurs nucléaires.

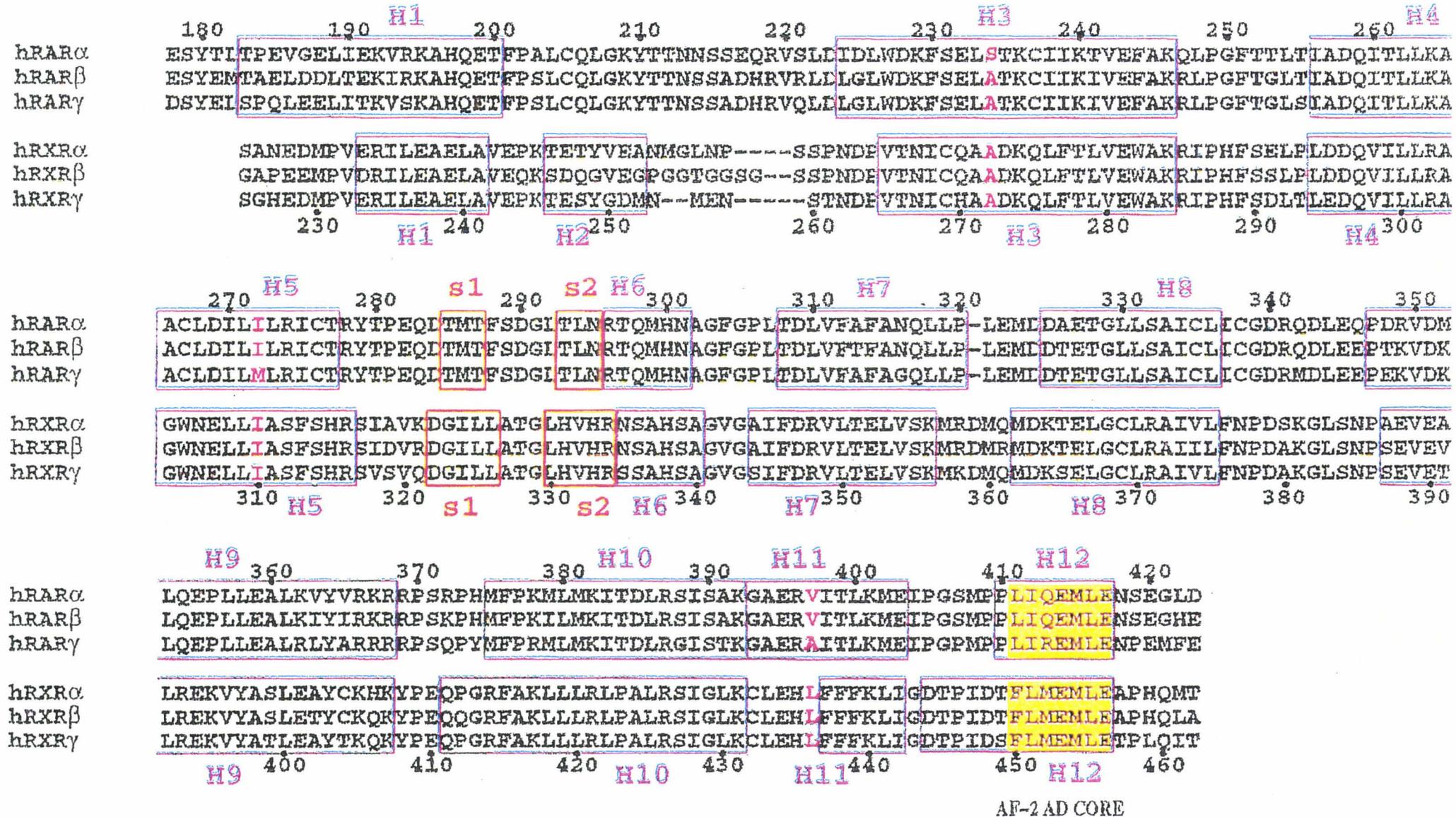


Fig. 23 : Alignement de séquences du domaine E des RARs et des RXRs (Renaud J.P. et al., 1995)

2.2. Acides aminés du domaine E essentiels à la liaison au ligand

2.2.1. Positionnement de *t*-RA dans le site de liaison d'après le modèle cristallographique de l'holo-LBD-hRAR γ

Dans le modèle cristallographique du LBD-hRAR γ , l'un des atomes d'oxygène de la fonction carboxylate de *t*-RA forme une liaison saline avec la lysine 236. Le second atome d'oxygène interagit avec le groupement hydroxyle de Ser 289 et forme une liaison saline avec Arg 278. H5 est placée perpendiculairement au-dessus de la chaîne polyénique de *t*-RA et les résidus Leu271, Met 272, Ile 275 et Arg 274 semblent directement interagir avec les groupements méthyles en C₉ et C₁₃ de *t*-RA. Les résidus Phe 304 et Gly 393 de la boucle 6-7 forme des liaisons avec les groupements méthyles substituants du cycle β -ionone. La leucine 400 de H11 entre en interaction avec le cycle β -ionone lui-même et les résidus Phe 230, Ala 234 et Cys 237 appartenant à l'hélice 3 positionnée près de la chaîne polyénique, se lient aux C₈ et C₁₃ de *t*-RA. Les acides aminés décrits ici sont situés à 4Å de *t*-RA dans la poche de liaison, d'autres résidus positionnés dans les mêmes hélices mais éloignés de 4.5Å sont également supposés former des liaisons hydrogène ou de Van der Waals (notés sur la fig. 24). Certaines données de la littérature obtenues à partir de mutations confirment l'interaction de ces résidus avec *t*-RA.

2.2.2. Positionnement de 9*c*-RA dans le site de liaison selon la cristallographie

Récemment, la cristallographie du domaine E de hRAR γ a également été réalisée en présence du 9*c*-RA (Klaholz B.P. et *al.*, 1998). Ce composé malgré une courbure plus marquée de son squelette carboné par rapport au *t*-RA, se positionne pratiquement de la même façon que *t*-RA dans la poche de liaison. La seule différence entre le positionnement de ces deux molécules réside au niveau de la méthionine 272 (H5) qui entre en contact avec le groupement méthyle en position 19 du 9*c*-RA. Ce phénomène permet d'expliquer la plus faible affinité de liaison du 9*c*-RA observée pour RAR γ compte tenu du fait que ce résidu de méthionine est remplacé par une isoleucine (qui possède une chaîne latérale plus compacte) dans RAR α et RAR β . Nous reviendrons sur ces acides aminés spécifiques dans le paragraphe

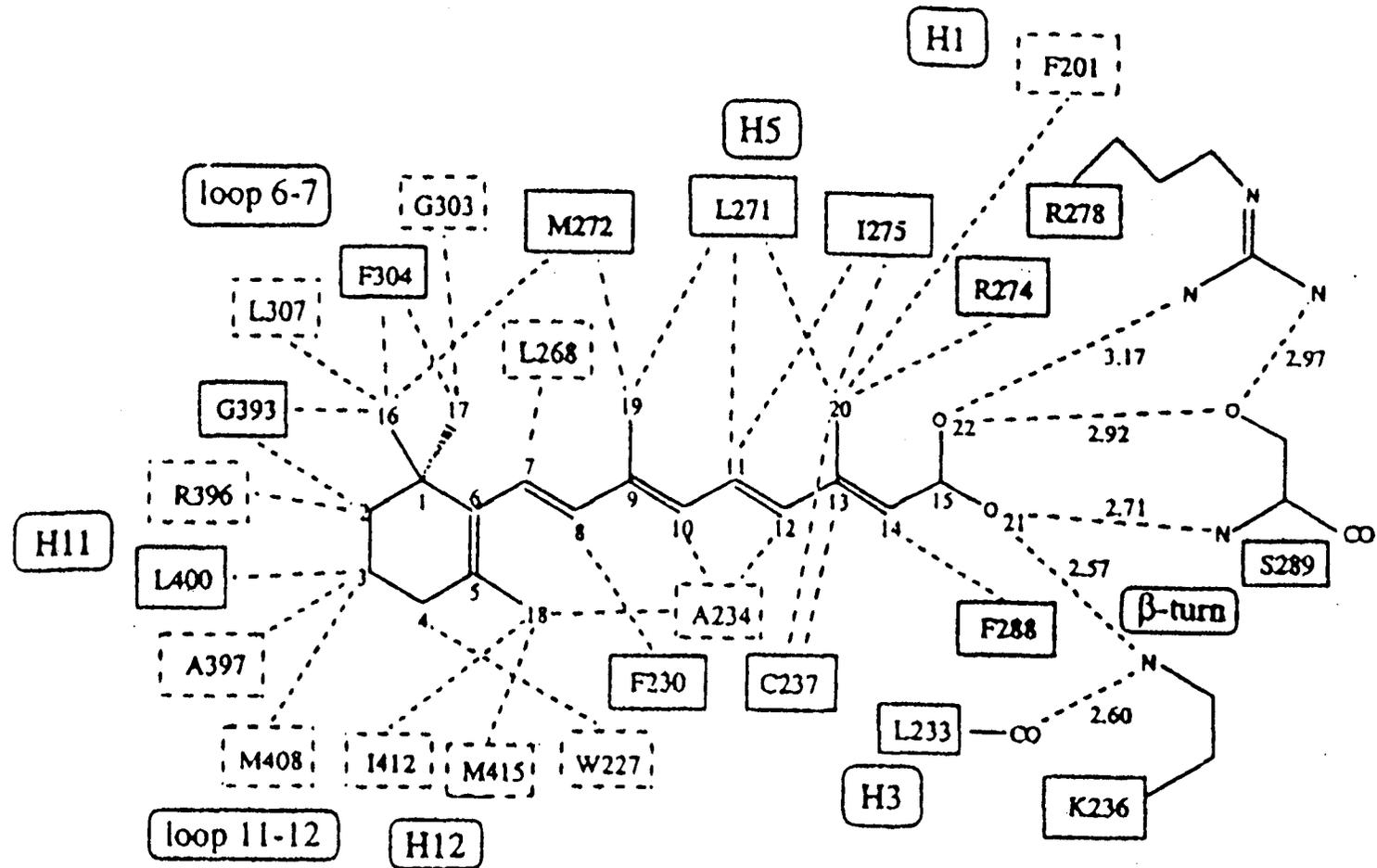


Fig. 24 : Les résidus d'acides aminés de la LBP de hRAR γ en contact avec *t*-RA (Renaud J.P. et al., 1995). Les acides aminés entourés d'un trait plein sont situés à 4Å de *t*-RA et ceux encadrés en pointillé se trouvent à 4.5Å de *t*-RA.

2.2.3.2. Le cycle β -ionone du 9c-RA ne semble pas interagir avec les résidus de l'hélice 12 mais plutôt se positionner dans une petite cavité à proximité de Ile 412.

2.2.3. Les résidus d'acides aminés de la LBP

Les résidus d'acides aminés qui se trouvent dans la LBP décrit par la cristallographie sont situés à une distance de 4 à 4.5Å de *t*-RA et forment des liaisons faibles directement avec le ligand. Différentes études confirment ces données. Un certain nombre de ces acides aminés a été identifié comme jouant un rôle dans l'activation des RARs par mutagenèse dirigée.

2.2.3.1. Mutations altérant la liaison de *t*-RA

En se basant sur l'hypothèse que les acides aminés chargés tels que l'arginine ou la lysine interagissent avec le groupement carboxylate de l'acide rétinoïque, Lamour F.P.Y. et *al.*, ont construit toute une série de mutants ponctuels de RAR α . Ils ont alors vérifié leur affinité de liaison, leur activité transactivatrice et leur conformation après protéolyse limitée en présence d'agonistes ou d'antagonistes (Lamour F.P.Y. et *al.*, 1996). Parmi tous les résidus d'arginine mutés, seuls les mutants dont l'Arg 276 et l'Arg 394 sont remplacées par une alanine, présentent une très faible affinité de liaison avec des ligands agonistes ou antagonistes, alors que la mutation Arg 272Ala n'entraîne qu'un effet modéré sur l'affinité de liaison. L'arginine 276 a également été mutée en alanine ou en glutamine par Scafonas A et *al.*, sur RAR α et par Tairis N. et *al.*, sur RAR β (Scafonas A. et *al.*, 1997, Tairis N. et *al.*, 1995) et le résultat de cette mutation confirme la réduction d'affinité de liaison et d'activité transactivatrice en présence d'un ligand agoniste observée par Lamour F.P.Y. et *al.* Ces données sont en accord avec la structure cristallographique de l'holo-LBD-RAR γ . En effet, les acides aminés chargés forment un environnement électrostatique qui permet de guider l'acide rétinoïque par l'intermédiaire de son groupement carboxyle à l'intérieur de la poche de liaison.

D'autres études ont été réalisées, en particulier pour mettre en évidence la participation de résidus cystéine dans l'interaction RARs-ligands. Dallery et *al.*, et Sani et *al.*, ont démontré que la perte d'affinité de liaison après traitement du domaine E/F de RAR α recombinant et des RARs de la peau de poulet, respectivement, avec différents réactifs chimiques modifiant les groupements sulfhydryles, impliquaient la présence de résidus de

cystéines à l'intérieur du site de liaison (Dallery N. et *al.*, 1993, Sani B.P. et *al.*, 1990). En tenant compte de ces observations, le groupe de Soprano a identifié les résidus de cystéine localisés dans la poche de liaison des RARs (Wolfgang C.L. et *al.*, 1997). Il a montré que l'action de réactifs chimiques tels que le DTNB et le MMTS, spécifiques des résidus de cystéine, inhibait la liaison au ligand de RAR α ainsi que de RAR β et de RAR γ mais de façon différentielle. Or, deux cystéines essentielles mutées en alanine ont été identifiées dans RAR β , Cys 228 et Cys 267. Seule la modification de Cys 228 est nécessaire quand RAR β est traité par le DTNB, réactif greffant un groupement encombrant sur les résidus de Cys (6-7,4Å) alors que les deux résidus de Cys, 228 et 267, doivent être modifiés quand il y a transfert d'un petit groupement fonctionnel tel qu'un groupement thiométhyle ou thiocyanide (3-4Å), pour obtenir l'inhibition totale de la liaison à l'acide rétinoïque. Selon leur hypothèse, Cys 228 doit donc être plus proche de l'entrée du site de liaison de RAR β alors que Cys 267 doit être plus enfouie à l'intérieur de la cavité.

2.2.3.2. Les résidus impliqués dans la sélectivité des RARs

L'alignement de séquences de RAR α , β et γ montre que seulement trois résidus d'acides aminés sont variables dans la cavité de liaison : Ala 234 dans RAR γ (Ser 232 dans α , Ala 225 dans β), Met 272 γ (Ile 270 α et Ile 263 β) et Ala 397 γ (Val 395 α et Val 388 β). Chez RAR γ Ala 234 et Met 272 interagissent avec la chaîne polyénique de *t*-RA et Ala 374 avec le cycle β -ionone. Ces trois résidus sont donc des candidats évidents pour justifier la sélectivité de certains rétinoïdes de synthèse, vis-à-vis des sous-classes de RARs.

2.2.3.2.1. Construction de récepteurs chimères

Avant de disposer des données de la cristallographie du domaine E de RAR γ , Ostrowski J. et *al.*, par la méthode de Chou-Fasman et Garnier avaient établi que la région N-terminale du domaine E de RAR α et β (correspondant à l'hélice 3) se conformait en une hélice amphipathique. Selon ce modèle, 5 acides aminés hydrophobes forment un motif "leucine zipper" à l'intérieur de cette hélice et deux des acides aminés variables, Ser 232 de RAR α (Ala 225 RAR β) et Thr 239 RAR α (Ile 232 β), sont situés à proximité de ce motif au niveau de la surface hydrophobe de l'hélice. Ils ont alors construit des récepteurs chimères RAR α /RAR β . Ainsi, le récepteur chimère RAR α contenant 70 acides aminés de la partie N-terminale du domaine E de RAR β (192-262) se comporte comme le récepteur RAR β avec

une affinité de liaison sélective similaire. Lorsque dans ce récepteur chimère, le résidu Ala 225 (RAR β) est remplacé par l'acide aminé correspondant dans RAR α Ser 232, le récepteur présente une sélectivité de réponse en terme d'affinité de liaison et de transactivation vis-à-vis de l'Am580 et de deux autres composés, identique au RAR α sauvage. Cet acide aminé est donc directement impliqué dans la sélectivité de liaison des récepteurs α et β (Ostrowski J. et *al.*, 1995). De plus, Ala 225 est située près de Trp 227 de RAR γ qui se trouve dans la LBP et qui semble également impliqué dans l'interaction RAR-ligand par analyse de quenching de fluorescence du tryptophane (Lupisella J.A. et *al.*, 1995). Par une étude plus approfondie, Ostrowski J. et *al.*, ont déterminé le rôle de la sérine 232 dans la sélectivité de RAR α en utilisant deux ligands synthétiques, l'Am580 spécifique de RAR α et l'antagoniste BMS185411 (Ostrowski J. et *al.*, 1998). Ce résidu de sérine dans RAR α interagit avec le groupement amide de l'Am580. Dans RAR β et RAR γ , Ser 232 correspond à une alanine. La présence du groupement amide hydrophile près de l'alanine hydrophobe diminue l'affinité de liaison de RAR β et de RAR γ pour l'Am580. En ce qui concerne l'effet antagoniste de BMS185411, il est proposé que Ser 232 forme une liaison hydrogène entre son groupement hydroxyle et la liaison amide du ligand et positionne ainsi ce composé près de l'hélice 3 et son groupement phényle près de l'hélice 12, empêchant de cette manière le changement de conformation nécessaire à l'activation du récepteur (fig. 25). Dans RAR β , il n'y a pas de liaison hydrogène entre Ala 225 et la liaison amide du ligand. De ce fait, le composé BMS185411 possède une certaine flexibilité à l'intérieur du site de liaison et n'interfère pas avec H12, il conserve alors une activité agoniste pour RAR β . En utilisant la même stratégie, ils ont identifié la méthionine 272 localisée dans H5, critique pour la sélectivité RAR γ vis-à-vis du ligand agoniste sélectif, le BMS185354. Il est donc possible qu'il y ait formation d'une liaison hydrogène entre l'atome de soufre de la méthionine et le substituant hydroxyle de BMS185354.

2.2.3.2.2. Les données de la cristallographie

Le rôle prépondérant de la méthionine 272 est confirmé par la structure cristallographique du site de liaison de hRAR γ en présence du BMS961 et du SR11254, ligands sélectifs de RAR γ (Klaholz B.P. et *al.*, 1998) possédant une faible affinité de liaison pour RAR β et aucune affinité pour RAR α . La structure du BMS961 fixé dans le site de liaison de RAR γ est similaire à celle du 9c-RA et adopte une flexion de 56° entre les deux cycles aromatiques. L'atome de fluor qui pointe vers l'alanine 234 de H3 peut être comparé

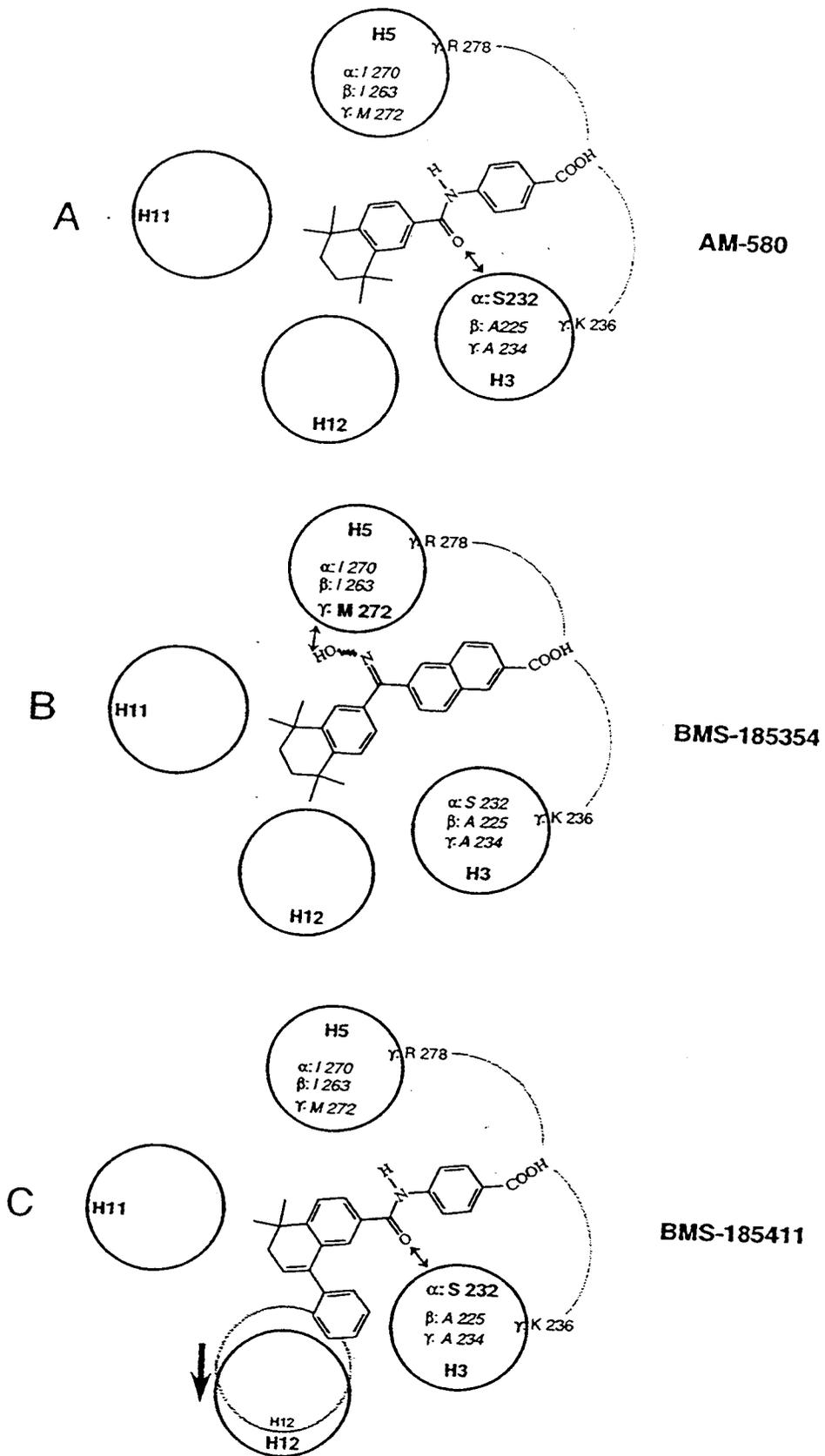


Fig. 25 : Modèle de l'interaction moléculaire entre RAR et des rétinoïdes sélectifs (Ostrowski J. et al., 1998)

au groupement méthyle en position 20 du 9*c*-RA. Le groupement hydroxyle se place de façon géométriquement correcte et à la même distance de la méthionine 272 pour permettre une liaison hydrogène. Le groupement NH de la fonction amide forme une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la leucine 271 et l'atome d'oxygène de ce groupement se positionne entre la phénylalanine 230, la phénylalanine 304 et la phénylalanine 288 dans une petite cavité. La position du carboxyle sur le cycle benzoïque correspond à celle de *t*-RA et de 9*c*-RA et engendre les mêmes liaisons hydrogène. Néanmoins, la sélectivité pour RAR γ peut s'expliquer par différentes raisons : 1) Il y a formation d'une liaison hydrogène entre Met 272 et le groupement hydroxyle du composé BMS961 alors que dans RAR α et β , la méthionine est remplacée par une isoleucine. 2) Le cycle β -ionone du ligand se positionne près de Ala 397 de H11 dans hRAR γ alors que dans RAR α et β , c'est un résidu de valine qui est un peu plus encombrant stériquement. 3) La perte d'affinité de liaison de RAR α pour le BMS961 peut résulter de la présence du résidu Ser 232 dans H3 au lieu de l'alanine 234 dans RAR β/γ . D'autre part, le groupement hydroxyle de ce résidu de sérine forme une liaison hydrogène avec la fonction amide de ligands tels que l'Am580 ou l'Am80 et permet d'expliquer leur sélectivité pour RAR α . En positionnant le ligand SR11254, agoniste de RAR γ , dans la poche de liaison, Klaholz B.P. et *al.*, ont constaté que l'interaction entre la fonction oxime du ligand et la méthionine 272 était optimisée par la linéarisation de la molécule. Ceci confirme le fait que le groupement hydroxyle des rétinoïdes tels que le CD666, le CD437 et le SR11254 est un déterminant crucial pour la sélectivité de RAR γ . Quand la fonction hydroxyle est protégée par un méthyléther, la sélectivité est alors modifiée en faveur de RAR β comme c'est le cas pour le CD417 et le CD271 (méthyléthers du CD437). Ces résultats obtenus grâce à des ligands synthétiques peuvent servir à expliquer l'interaction de *t*-RA avec RAR α , β et γ . Quand *t*-RA se lie à RAR β , il rencontre un environnement entièrement hydrophobe, tout comme dans RAR γ bien que Met 272 soit partiellement hydrophobe (les K_d sont de 0,5 et de 1nM respectivement). Alors que dans RAR α , la présence de Ser 232 génère un caractère hydrophile partiel au site de liaison et entraîne une augmentation du K_d apparent (1,7nM).

Hormis les trois acides aminés divergents entre les trois sous-classes de RARs, au niveau de la poche de liaison, il existe d'autres caractéristiques structurales qui leur confèrent des propriétés propres. Seules les hélices 1 et 3 contiennent des résidus non conservés entre RAR α et RAR β : 6 résidus sur 18 pour H1 (Ala 182, Val 184, Gly 185, Glu 186, Ile 188, Val 190 RAR α) et 4 sur 23 dans H3 (Ile 222, Asp 223, Ser 232 et Thr 237 RAR α). De plus, 3 des 5 acides aminés chargés positivement, potentiellement impliqués dans l'orientation

électrostatique de *t*-RA dans RAR γ sont localisés dans H3 et les 2 autres se situent dans H1. Par conséquent, ces acides aminés divergents dans H1 et H3 doivent jouer un rôle important dans la définition de l'orientation et de l'environnement électronique et permettre d'établir une sélectivité des rétinoïdes pour les trois sous-classes de récepteurs.

2.2.4. Les résidus d'acides aminés extérieurs à la LBP

D'autres résidus d'acides aminés qui ne se situent pas dans la LBP ont été analysés grâce à des expériences de mutagenèse dirigée et semblent jouer un rôle dans le changement de conformation du récepteur induit par la fixation du ligand. Leur mutation altère donc la liaison du ligand et la capacité de transactivation du récepteur de manière indirecte. Ces changements de conformation dépendent en général de la structure du ligand.

2.2.4.1. Les résidus jouant un rôle en présence d'un ligand agoniste

Dans leurs travaux sur les récepteurs chimères, Ostrowski J. et *al.*, ont également étudié le rôle de l'isoleucine 232 (RAR β) ou thréonine 239 (RAR α) sur l'affinité de liaison et la capacité de transactivation de ces récepteurs en présence de l'Am580. Bien que cet acide aminé ne soit pas dans la LBP, il semble impliqué dans la réponse sélective en fonction du ligand. D'autre part, la substitution des deux résidus, Arg 212 et Ile 246 de RAR β , par les résidus Gln 212 et Ser 246 de RAR γ , agit légèrement sur la capacité de transactivation de ces récepteurs en fonction du ligand utilisé mais ces deux mutations ne sont pas suffisantes pour convertir une réponse ligand sélective RAR β en réponse RAR γ . Ceci suggère que ces deux acides aminés Gln 212 et Ser 246 ne sont pas en contact direct avec le ligand mais agissent sur la conformation du récepteur induite par le ligand. Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour le résidu de lysine 220 de RAR β (Lys 227 RAR α) muté en alanine ou en glutamine par Tairis N. et *al.*, sur RAR β et Scafonas A. et *al.*, sur RAR α (Tairis N. et *al.*, 1995, Scafonas A. et *al.*, 1997). Ainsi dans RAR α , la lysine 227 ne semble pas essentielle à la liaison du ligand et à la transactivation du récepteur alors que dans RAR β , cette lysine 220 agit de façon importante sur l'activité de transactivation du récepteur en synergie avec Arg 269. Ce résidu de lysine joue donc un rôle dans la sélectivité du récepteur pour son ligand simplement de manière conformationnelle. La cystéine 267 dans RAR α identifiée par Wolfgang C.L. et *al.*, et supposée proche de l'extrémité carboxyle de *t*-RA, appartient en

réalité à ce groupe de résidus qui ne se trouvent pas dans la LBP mais permettent par induction d'un changement conformationnel, l'effet de ligands spécifiques et la transactivation.

2.2.4.2. Les résidus C-terminaux du domaine E

En construisant des mutants tronqués des 15 acides aminés de la région C-terminale du domaine E de RAR α et des mutants ponctuels tels que Met406Ala, Ile410Ala et Pro 407Ala, Tate B.F. et Grippo J.F. ont constaté une perte ou une diminution de l'affinité de liaison de 9c-RA par rapport à *t*-RA (5.6%, 4%, 14% d'affinité de liaison respectivement pour les mutants ponctuels) (Tate B.F. et Grippo J.F., 1995). De plus, en remplaçant Met 406 soit par Leu, Ile, Val, Thr ou Ala, l'affinité de liaison de 9c-RA diminue de façon inversement proportionnelle en fonction de la taille et peut-être de l'hydrophobicité de la chaîne latérale des acides aminés. En outre, un ligand analogue au 9c-RA substitué par un groupement alkyle en C₉ de la chaîne polyénique restaure l'affinité de liaison du mutant Met 406Ala. Ils avaient donc supposé que Met 406 et peut-être Ile 410 de RAR α interagissaient avec le 9c-RA. Ces résultats semblaient confirmés par les profils de protéolyse limitée réalisés sur des mutants de délétion en présence de *t*-RA ou de 9c-RA montrant l'implication de la région 187-402 pour la liaison de *t*-RA et de la région 188-409 pour la liaison de 9c-RA (Keidel S. et *al.*, 1997). La région 403-410 correspondant à la boîte L ne semblait donc pas affecter la liaison de *t*-RA mais elle devenait cruciale pour la liaison de 9c-RA. Cependant, selon la cristallographie sur RAR γ , le 9c-RA ne semble pas interagir avec les résidus de H12 contrairement à *t*-RA (avec Met 408). Néanmoins, d'autres études démontrent aussi l'importance de cette région dans la liaison au ligand mais avec deux ligands sélectifs de RAR α (Am580 et Am80) (Lefebvre B. et *al.*, 1995). Compte tenu de ces différents résultats, la conformation de la poche de liaison semble donc légèrement différente d'un récepteur à l'autre (la cristallographie a été réalisée sur RAR γ et les mutants de délétion sur RAR α) et dépendante du ligand qui s'y fixe. De plus, il est établi par la cristallographie que les résidus Glu 414 et Glu 417 situés dans H12 forment des liaisons salines avec Lys 264 (H4) pour faire pivoter l'hélice 12 et refermer le site de liaison. Ces deux résidus situés dans la même région jouent donc un rôle dans la stabilité du complexe récepteur-ligand. Ainsi, sans interagir directement avec le ligand, les résidus de cette région C-terminale peuvent tout de même affecter sa liaison par modification conformationnelle.

2.2.5. Comparaison des données obtenues par mutagenèse dirigée avec les résidus de la poche de liaison de hRAR γ en présence de *t*-RA

A titre d'illustration, nous avons placé sur le modèle moléculaire LBD-hRAR γ établi à partir des données de la cristallographie les résidus d'acides aminés qui ont été étudiés par mutagenèse dirigée par différents groupes (tab. 5) et que nous venons de décrire. D'une part, nous avons positionné les résidus appartenant à la LBP (fig. 26) et d'autre part, ceux qui se trouvent en-dehors de cette poche mais qui agissent d'un point de vue conformationnel sur l'activité du récepteur induite par la fixation du ligand (fig. 27). Ces données sont en accord avec les résultats obtenus. Néanmoins, dans ce genre de comparaison, il est nécessaire de garder en mémoire qu'il existe des différences structurales entre les trois RARs et que par conséquent, la conformation observée par cristallographie du domaine E de RAR γ n'est pas forcément identique à celle de RAR α et de RAR β .

3. Apport de la cristallographie sur la structure des ligands fixés dans la poche de liaison

En règle générale, nous représentons les molécules de ligands d'une façon statique, rigide, en plaçant de préférence les groupements substituants au-dessus de la chaîne carbonée. Or, la structure de ces ligands est très flexible et varie selon les interactions avec les résidus au sein du site de liaison. Prenons l'exemple de *t*-RA, lorsqu'il est fixé dans la poche de liaison de hRAR γ , il adopte une conformation par flexibilité intrinsèque assez proche de celle de 9*c*-RA (Klaholz B.P. et *al.*, 1998). La différence essentielle de ces deux structures ne réside donc pas dans la conformation Z du 9*c*-RA par rapport à *t*-RA ou dans l'orientation du groupement méthyle en position 20 plutôt responsable de la spécificité de liaison dans RXR mais au niveau de l'orientation du méthyle en position 19 qui repousse de 0.9Å la méthionine 272 de RAR γ . Ce déplacement entraîne alors la rotation de la chaîne latérale de Ile 398 (H10). L'affinité de liaison plus faible de 9*c*-RA pour RAR γ serait donc essentiellement due à l'encombrement stérique de ce groupement méthyle vis-à-vis de Met 272. La structure du BMS961, ligand agoniste de RAR γ , s'oriente de la même manière que celle de 9*c*-RA dans le site de liaison. Ce sont des points de flexion imposés par les résidus de la cavité de liaison à la structure du ligand ainsi que l'orientation des groupements substituants déterminée selon l'espace disponible entre les résidus qui confèrent la sélectivité aux différents composés. De

	Mutations	Position	Références	
Acides aminés de la LBP (d = 4 à 4.5 Å de <i>t</i> -RA)	C228A RAR β ou C235A RAR α	H3	Wolfgang C.L. et al., 1997, Lamour F.P.Y. et al., 1996	
	F230Y RAR γ	H3	Renaud J-P et al., 1995	
	R269A(Q) RAR β ou R276A RAR α	H5-s1	Tairis N. et al., 1995, Scafonas A; et al., 1997, Lamour F.P.Y. et al., 1996	
	R272A RAR α	H5	Lamour F.P.Y. et al., 1996	
	G301R RAR α	H6-H7	Durand B. et al., 1994	
	R394A RAR α	H11	Lamour F.P.Y. et al., 1996	
	Acides aminés non conservés dans les 3 RARs	S232 (RAR α) et A225 (RAR β)	H3	Ostrowski J. et al., 1995
		M272 (RAR γ)	H3	Ostrowski J. et al., 1998
		A397T RAR γ	H11	Renaud J-P et al., 1995
	Acides aminés indirectement impliqués dans l'activation du récepteur par le ligand	<i>t</i> -RA	G303E RAR α	H6-H7
C267A RAR β			H5	Wolfgang C.L. et al., 1997
9 <i>c</i> -RA		M406A RAR α	H11-H12	Tate B.F. et Grippo J.F., 1995
		P407A RAR α	H11-H12	Tate B.F. et Grippo J.F., 1995
Ligands sélectifs		I410A RAR α	H12	Tate B.F. et Grippo J.F., 1995
	K220A(Q) RAR β et K227 RAR α	H3	Tairis N. et al., 1995, Scafonas A. et al., 1997	
	T239 (RAR α) et I232 (RAR β)	H3	Ostrowski J. et al., 1995	
Antagonistes	R212Q RAR β	H1-H3	Ostrowski J. et al., 1998	
	R217A RAR α	H1-H3	Lamour F.P.Y. et al., 1996	
	R294A RAR α	H6	Lamour F.P.Y. et al., 1996	

(Numérotation : de RAR α à RAR β : -7
de RAR α à RAR γ : +2
de RAR β à RAR γ : +9)

Tab. 5 : Acides aminés, identifiés par mutagenèse, jouant un rôle dans l'activation des RARs

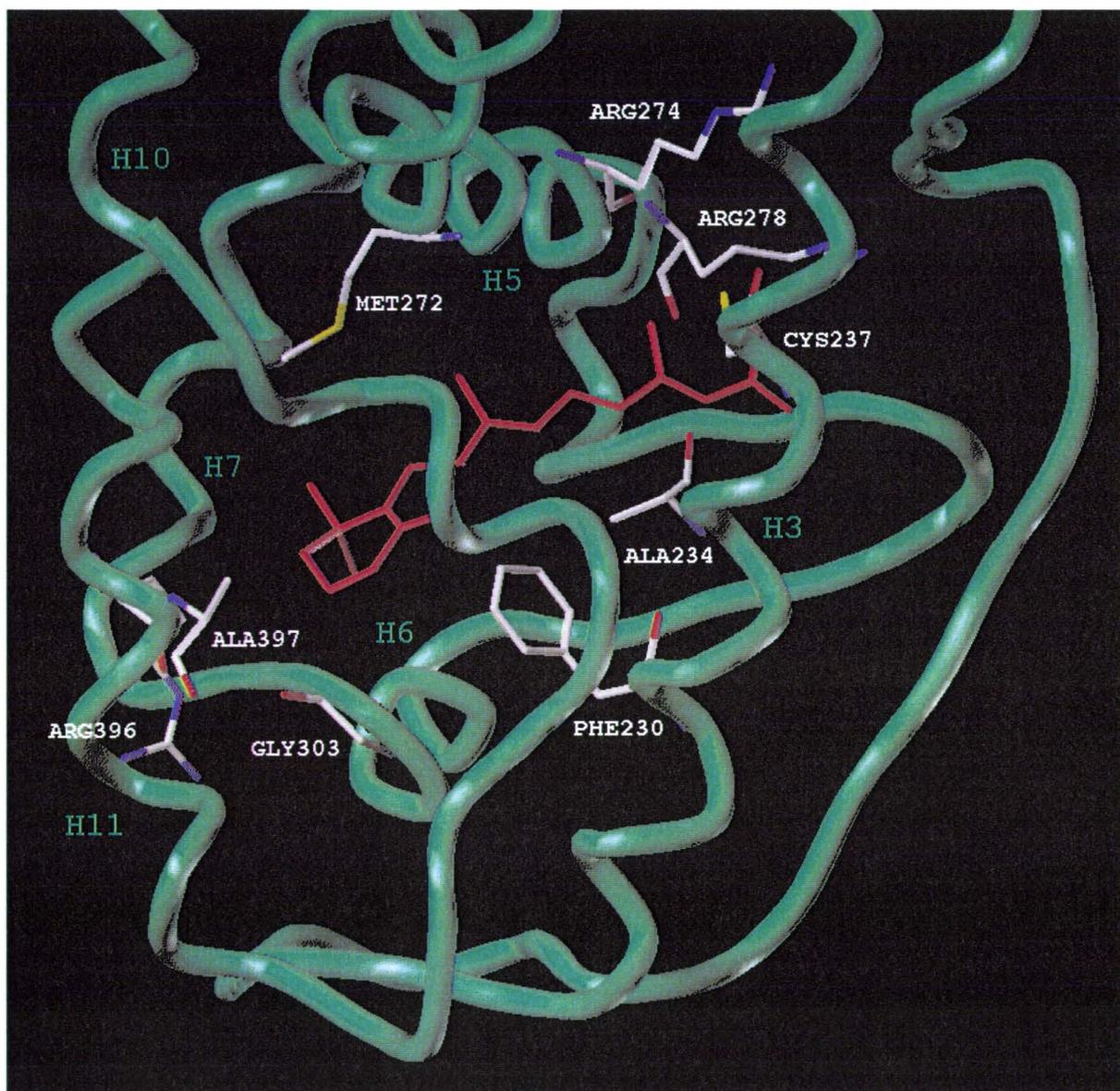


Fig. 26 : Positionnement dans le modèle LBD-hRARG des acides aminés déterminant dans la liaison au ligand

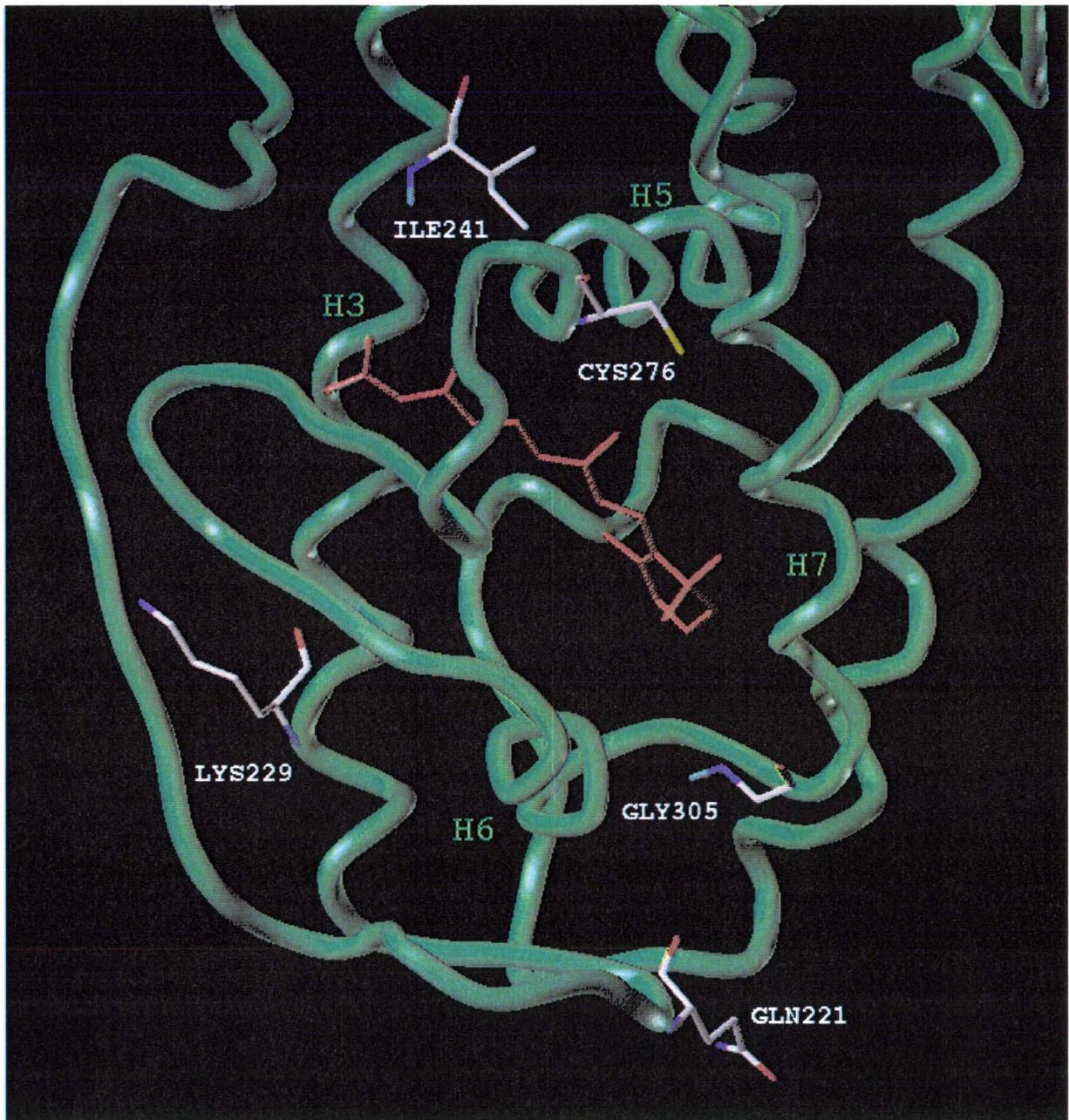


Fig. 27 : Positionnement dans le modèle LBD-hrAR γ des acides aminés extérieurs à la LBP jouant un rôle dans l'activité du récepteur

plus, dans les modèles élaborés par Ostrowski J. *et al.*, sur les interactions possibles entre les ligands synthétiques sélectifs et les résidus des hélices de RAR γ , nous remarquons que la molécule d'Am580 est retournée par rapport à la représentation schématique classique de façon à ce que l'atome d'oxygène de la fonction amide puisse interagir avec la serine de l'hélice 3 spécifique de RAR α . Il en est de même pour le composé BMS185411. Cependant, cette molécule est substituée par un groupement aromatique en C₁, très encombrant, qui repousse l'hélice 12 conférant alors le caractère antagoniste de ce ligand sur RAR α . Les molécules des ligands ne sont donc pas des structures figées dans une conformation précise mais adaptables au site de liaison (fig. 28).

4. L'action des antagonistes sur le mécanisme d'activation des RARs

En corrélation avec le mécanisme d'activation des récepteurs nucléaires par les ligands agonistes, il existe un mécanisme d'action des antagonistes. Comme le simple changement d'un groupement substituant dans la structure d'un ligand agoniste est suffisante pour convertir ce composé en un antagoniste, les recherches se sont orientées sur les différences de structure des rétinoïdes qui peuvent induire une conformation particulière du récepteur. Depuis quelques années, il est connu que l'absence d'activation transcriptionnelle des récepteurs stéroïdiens par les antihormones implique l'induction d'une conformation inappropriée de l'extrémité carboxyterminale du domaine E de liaison (Allan G.F. *et al.*, 1992, Modarress K.J. *et al.*, 1997, Ekena X. *et al.*, 1997). Par protéolyse limitée, Keidel S. *et al.*, ont montré que les antagonistes entraînent en compétition avec les agonistes pour la liaison de RAR α et induisait une altération structurale en donnant un fragment de 25kDa après digestion par la trypsine au lieu de 30kDa en présence d'agonistes (Keidel S. *et al.*, 1994). De plus, un mutant RAR α tronqué d'une part, de sa région F (jusque l'acide aminé 414) semble plus sensible à l'hydrolyse par la trypsine ou la chymotrypsine en présence d'un antagoniste. D'autre part, un mutant tronqué de la partie C-terminale du domaine D nécessaire à la liaison de *t*-RA et de 9*c*-RA et de la partie N-terminale du domaine E (155 à 266) lie très bien l'antagoniste Ro41-5253 (Keidel S. *et al.*, 1997). Le résidu de Cys 235, situé dans H3 de RAR α , est particulièrement important dans la liaison avec des antagonistes de la série du Ro41-5253 (Lamour F.P.Y. *et al.*, 1996). Ainsi, H3 est sûrement impliquée dans la transconformation de H12, nécessaire à l'activation du récepteur par un agoniste ou antagoniste. De plus, la partie C-terminale de H1 recouvre la partie C-terminale de H3. De façon surprenante, toute l'hélice 1 peut être ôtée sans perturber la liaison de l'antagoniste

alors qu'elle abolit la liaison d'un agoniste. De ce fait, il se peut que H1 stabilise la position spatiale de H3 nécessaire spécifiquement à la liaison des ligands agonistes. De même, les mutants Arg217Ala et Arg294Ala ont une affinité de liaison pour le ligand antagoniste Ro41-5253 augmentée de 2 à 12 fois par rapport au RAR α sauvage (Lamour F.P.Y. et *al.*, 1996). En considérant la structure de hRAR γ , Arg 217 se localise dans la boucle Ω juste avant H3 et Arg 294 se situe au début de l'hélice 6. Le changement de conformation imposé par la liaison du ligand implique un déplacement de cette boucle pour obtenir une structure plus compacte. La digestion par la trypsine du mutant hRAR α -Arg217Ala lié au Ro41-5253 donne deux fragments protéiques. Un fragment de 30kDa spécifique des ligands agonistes et un fragment d'un kDa supérieur au fragment spécifique obtenu après digestion en présence de l'antagoniste. Compte tenu du fait que le site de clivage C-terminal du fragment obtenu en présence d'un antagoniste, est localisé entre les acides aminés 420 et 438 (Keidel S. et *al.*, 1994), Arg 217 se trouve dans la boucle Ω qui pourrait être accessible à l'action de la trypsine. En mutant cet acide aminé, le site de clivage est détruit et la trypsine ne peut pas hydrolyser à ce niveau. La région nécessaire à l'action antagoniste serait comprise entre les acides aminés 226 et 414 de RAR α .

La structure cristallographique du LBD du récepteur des oestrogènes a également été établie en présence du ligand agoniste, le 17 β -oestradiol (E_2) et d'un ligand antagoniste, le raloxifène (RAL) (Bzrozowski A.M. et *al.*, 1997) (fig. 29). La conformation du domaine de liaison est identique à celle de RAR γ . Elle est composée de 12 hélices α , de deux feuillets β et adopte un repliement en 3 couches. La cavité de liaison au ligand occupe un large espace dans le coeur hydrophobe du domaine E. Elle est localisée à une extrémité de la molécule et est formée par une partie de H3 (Met 342 à Leu 354), H6 (Trp 383 à Arg 394), H8 et la boucle H7-H8 (Val 418 à Leu 428), H11 (Met 517 à Met 528), H12 (Leu 539 à His 547) et les deux feuillets β (Leu 402 à Leu 410). E_2 se fixe en diagonale dans la poche en formant principalement des liaisons avec des résidus de H11 (His 524), de H3 (Glu 353) et de H6 (Arg 394). Le RAL se lie au même endroit que E_2 dans le LBD, cependant la conformation induite par la fixation du ligand agoniste ou antagoniste est différente et en particulier le positionnement de l'hélice 12. Cette hélice est déplacée de 130° en présence du RAL, perturbant ainsi la topographie de surface de l'AF-2 nécessaire à la transactivation ou empêchant l'interaction avec les coactivateurs. En outre, selon le modèle cristallographique du PR (Williams S.P. et Sigler P.B., 1998), il apparaît que l'anti-progestatif RU486 entraîne un déplacement de l'hélice 12 permettant aux corépresseurs présumés de venir se fixer. Cette

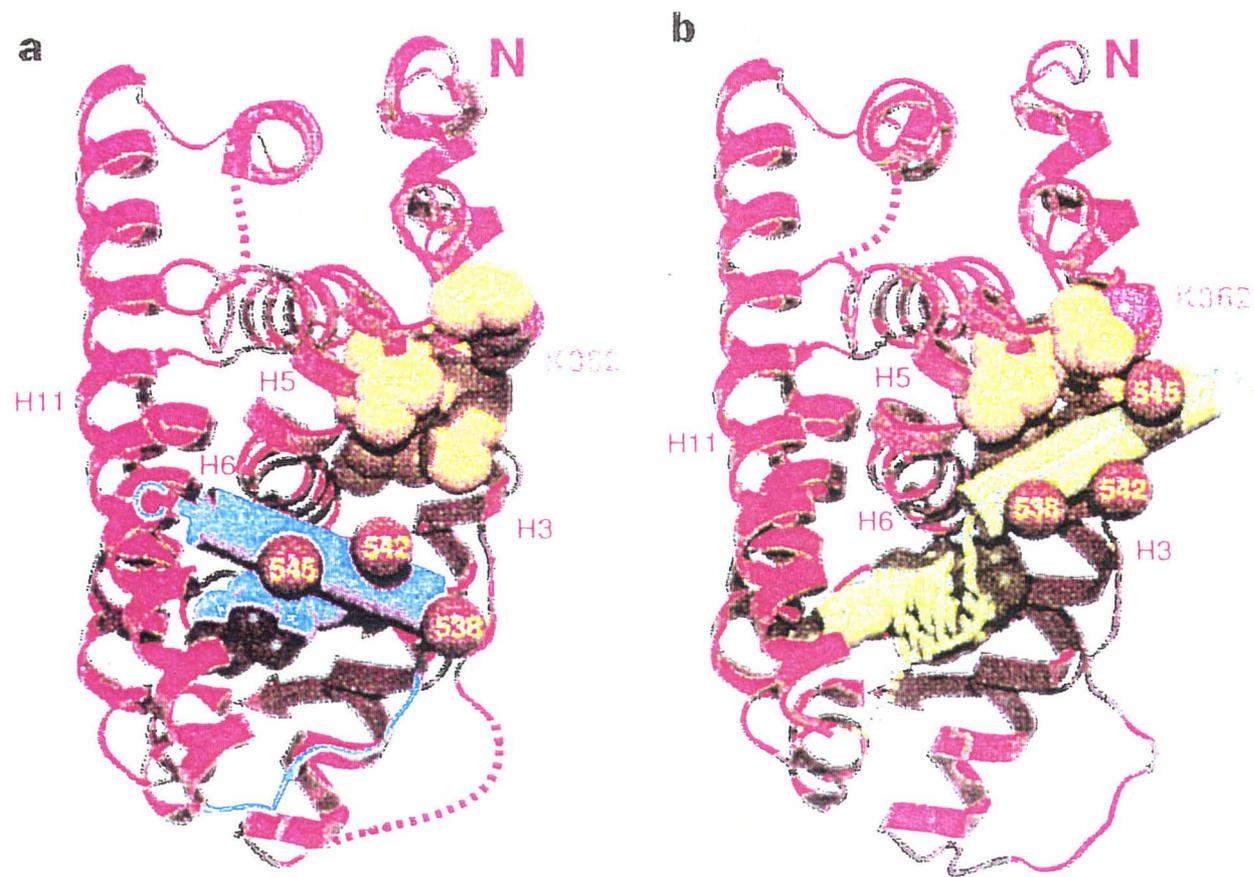


Fig. 29 : Modèle cristallographique du LBD-ER en présence d'un ligand agoniste et d'un ligand antagoniste (Bzrozowski A.M. et *al.*, 1997)

structure est le premier exemple de conformation du domaine E des récepteurs nucléaires stéroïdiens qui fournit un modèle instructif de l'interaction de ligands agonistes ou antagonistes, applicable aux membres de cette famille.

5. La spécificité de liaison du domaine E de RXR

Les modèles cristallographiques révèlent également deux différences importantes entre le site de liaison de RAR et de RXR pouvant expliquer la spécificité de 9c-RA pour le RXR. Premièrement, l'alanine 394 dans RAR γ (Valine chez RAR β et α) est remplacée par une leucine 436 chez tous les RXRs. Cette leucine se trouve dans H11 et interagit directement avec le groupement méthyle C₁₉ de 9c-RA. Ainsi, cet acide aminé encombrant réduit la taille de la poche de liaison, empêchant par la même occasion, le *t*-RA de venir se fixer. Deuxièmement, l'isoleucine 275 dans H5 de RAR correspond à la phénylalanine 313 dans RXR. L'orientation de cette Phe peut stériquement favoriser la liaison de 9c-RA. Ces acides aminés ont d'ailleurs été mutés et les résultats confirment leur rôle crucial dans la spécificité du ligand pour les RXRs (Peet D.J. et *al.*, 1998). En effet, le fait de muter seulement la Phe 313 en Ile et/ou la Leu 436 en Phe génère deux nouvelles classes de protéines RXR avec des spécificités de liaison au ligand modifiées. La première classe de récepteurs est peu activée par la liaison de 9c-RA mais l'est beaucoup plus par les ligands synthétiques (LGD1069, LG100153, LG100268). La seconde classe de protéines reste activée par le 9c-RA mais répond moins bien aux ligands de synthèse. Ainsi, bien qu'il n'y ait pas de différence de séquences entre les sites de liaison des trois sous-classes de RXRs, suggérant la difficulté de synthétiser des ligands sélectifs, il est possible en étudiant la plasticité de la poche de liaison de RXR, grâce à ces nouvelles constructions d'obtenir de nouveaux ligands spécifiques. L'importance du résidu Phe 313 est d'autant plus grande que, lorsqu'il est muté en alanine, il génère un mutant RXR α Phe318Ala constitutif avec des caractéristiques structurales et fonctionnelles identiques à celles provoquées par la liaison d'agoniste sur le récepteur RXR sauvage de souris (Vivat V. et *al.*, 1997).

IV. La Transactivation

Les travaux de recherche de ces dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires sont au centre d'un système complexe de régulation et que la fixation d'un ligand n'est pas toujours suffisante pour que le récepteur induise l'expression d'un gène

(Katzenellenbogen J.A. et *al.*, 1996). Certains récepteurs doivent subir une translocation du cytoplasme vers le noyau. Puis une fixation de forte affinité sur l'ADN peut impliquer la dimérisation du récepteur avec d'autres récepteurs nucléaires. Avant et/ou après cette fixation, plusieurs phosphorylations peuvent avoir lieu. Le récepteur doit alors interagir directement ou indirectement avec la machinerie transcriptionnelle pour que l'expression du gène cible soit induite.

1. La liaison à l'ADN

1.1. Le domaine de liaison à l'ADN

Le domaine C est responsable à lui seul de la reconnaissance des éléments de réponse situés sur l'ADN (HREs). Il est formé de 66 à 68 acides aminés et contient 8 résidus de cystéine conservés entre les récepteurs de la superfamille et un grand nombre d'acides aminés basiques. Au niveau structural, ce domaine se divise en deux régions CI et CII chacune formée d'un motif dit en "doigt de zinc" analogue à celui du facteur de transcription TFIIIA de Xénope. Dans la première région, quatre résidus de cystéine chélatent un ion zinc (formation d'une liaison de coordination tétraédrique) induisant une boucle (appelée doigt) de 13 acides aminés entre le résidu de Cys2 et Cys3 (Green S. et Chambon P., 1988, Evans R. M., 1988). La deuxième structure est formée d'une boucle de 10 à 12 acides aminés. Ces deux régions CI et CII sont séparées l'une de l'autre par 15 à 17 acides aminés. Ce modèle, confirmé par la structure cristallographique du domaine de liaison à l'ADN des GRs (Freedman L.P. et *al.*, 1988, Luisi B.F. et *al.*, 1991), est applicable à tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Hård T. et *al.*, 1990, Schwabe J.W. et *al.*, 1993, Rastinejad F. et *al.*, 1995). Ces deux motifs diffèrent structuralement et fonctionnellement. La boucle du premier motif CI est formée d'un feuillet β alors que la boucle du motif II comprend une région en hélice α . Cette structure β permet d'orienter les acides aminés impliqués dans la liaison avec les groupements phosphate de l'ADN et avec l'aide de l'hélice α en position carboxy-terminale, cette région CI vient se placer dans le grand sillon de l'ADN et est responsable de la spécificité de reconnaissance de l'HRE. La région CII se place par contre dans l'axe de la double hélice et semble plutôt impliquée dans le phénomène de dimérisation.

A l'intérieur de ce domaine C des régions spécifiques impliquées dans la liaison à l'ADN ou dans la dimérisation ont été définies par mutagenèse dirigée. Ces régions sont appelées les boîtes P, T, A, H, D et DR (fig. 30).

- **La boîte P** ou proximale se situe à la base du motif CI et au début de la région reliant les deux structures CI et CII. Elle est responsable de l'identification de la séquence primaire nucléotidique (Umesono K. et Evans R.M., 1989, Wilson C.C. et *al.*, 1996). Dans cette région, trois acides aminés, identifiés par mutagenèse dirigée, sont essentiels à la spécificité de reconnaissance selon le type de récepteur et l'élément de réponse : Gly, Ser, Val pour hPR, hMR, hAR, hGR, Glu, Gly, Ala pour hER et Glu, Gly, Gly pour hRAR, hRXR, hT₃R et hVDR (Mader S. et *al.*, 1989, Green S. et *al.*, 1988).

- Les structures en solution des domaines de liaison à l'ADN de RAR β et de RXR α présentent une structure similaire (Knegtel R.M.A. et *al.*, 1993, Lee M.S. et *al.*, 1993, Katahira M. et *al.*, 1992). Ils possèdent une petite hélice α supplémentaire en C-terminal de la région CII au niveau du domaine charnière D (résidus 67-78). Cette hélice, appelée **boîte T**, est repliée en une boucle impliquée dans l'association de dimères mais également dans l'interaction avec l'ADN et plus particulièrement dans la liaison coopérative d'homodimères RXR sur des éléments de réponse de type DR-1.

- Chez le récepteur orphelin NGF1-B liant l'élément de réponse NBRE limité à 8 nucléotides en un seul site, la **boîte A** a été identifiée comme responsable de la reconnaissance de l'adénine 5' au niveau du site de liaison à l'ADN. Cette boîte formant une hélice α d'environ 6 résidus d'acides aminés est localisée près de la boîte T en position C-terminale (Wilson T.E. et *al.*, 1992). Cette même structure a été retrouvée dans le récepteur des hormones thyroïdiennes et joue un rôle important dans la formation d'homodimères TR/TR ou d'hétérodimères RXR/TR (Kurokawa R. et *al.*, 1993). Cette fonction est confirmée par le modèle cristallographique du domaine de liaison à l'ADN de RXR α ou TR β sur un élément de réponse TRE DR-4. Elle permet la stabilisation de la liaison à l'ADN au niveau du petit sillon. En effet, dans la structure de TR, la boîte A est localisée dans une longue hélice α composée de 24 résidus d'acides aminés dont la plupart sont des résidus chargés (Rastinejad F. et *al.*, 1995). Cette hélice augmente significativement l'interface TR/ADN en formant des liaisons avec les groupements phosphate des nucléotides du petit sillon de l'ADN. Néanmoins, l'espacement entre les demi-sites de l'élément de réponse joue un rôle

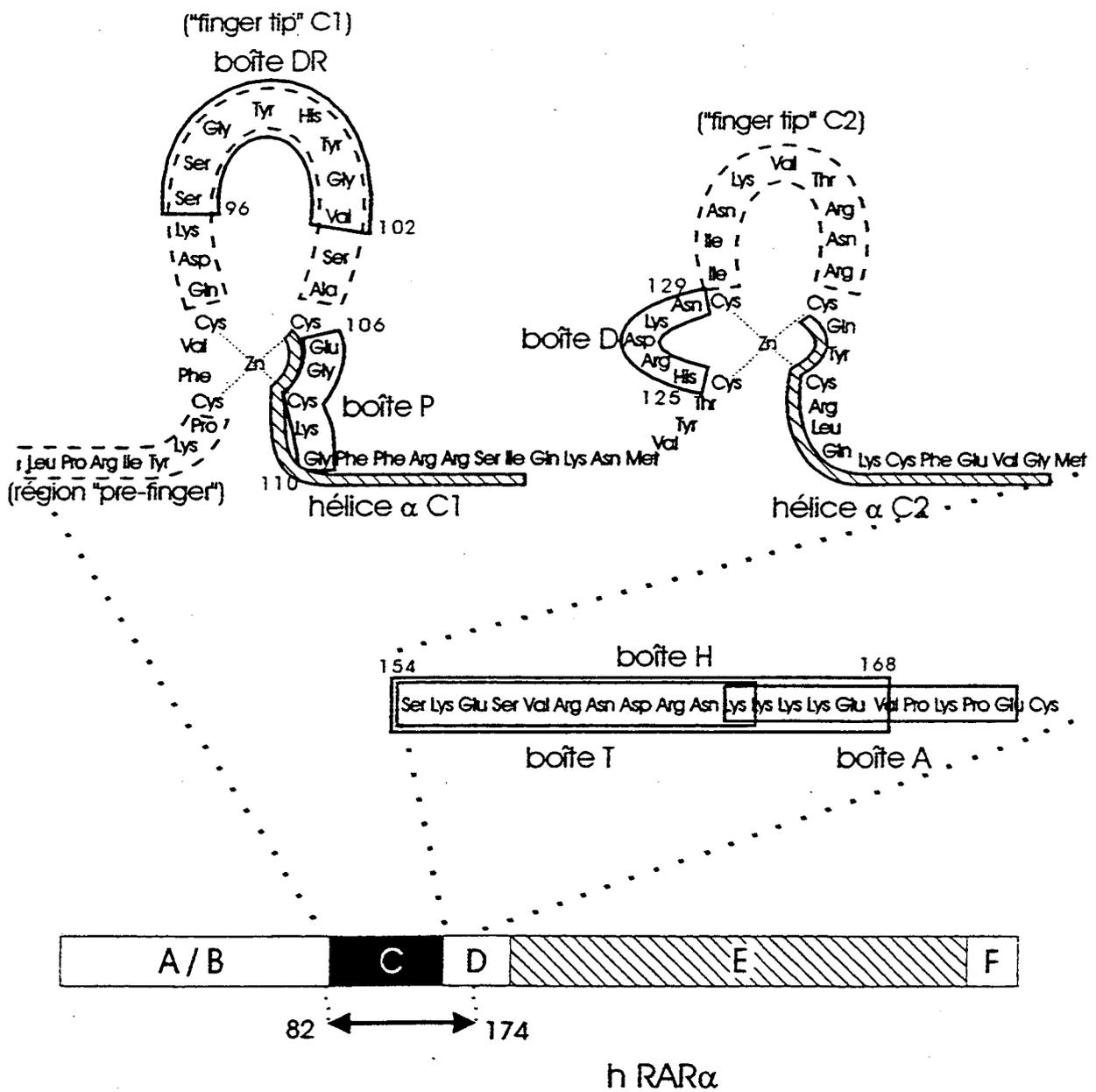


Fig. 30 : Structure du domaine de liaison à l'ADN de hRAR α (représentation schématique d'après Lefebvre B., 1997)

discriminant dans le positionnement de cette hélice. L'existence de cette région n'a pas encore été prouvée chez tous les récepteurs de la superfamille. En effet, chez les récepteurs stéroïdiens ER et GR cette même région n'est pas structuralement définie et ne semble pas interagir avec l'ADN (Schwabe J.W.R. et *al.*, 1993, Hård T. et *al.*, 1990). Chez les VDR et GR, cette région forme également une hélice α mais elle contient en plus les signaux de localisation nucléaire.

- Pour les RARs, d'autres déterminants critiques du récepteur ayant une forte affinité de liaison à l'ADN ont été mis en évidence (Predki et *al.*, 1994). Ces acides aminés se situent en partie dans la boîte T et en partie dans la boîte A pour donner la **boîte H**. Celle-ci interagit probablement au niveau du petit sillon de l'ADN.

- Les résidus contribuant au phénomène de dimérisation du récepteur n'occupent pas une position déterminée. Ils sont relativement spécifiques du domaine de liaison à l'ADN de chaque type de récepteur et assurent un mode de dimérisation unique en fonction de l'élément de réponse. La **boîte D** ou distale forme un feuillet β localisé entre la Cys5 et Cys6 à la base du doigt de zinc II. Elle est importante dans la détermination de l'espacement entre les demi-sites de liaison de l'ADN (Umesono K. et Evans R.M., 1989). Par exemple, la boîte D de RXR et la séquence adjacente, sont indispensables à l'hétérodimérisation. Par contre, la boîte D de RAR n'intervient pas dans l'hétérodimérisation. Son absence ou sa présence ne favorise pas et n'inhibe pas la capacité de récepteurs chimères à hétérodimériser avec le DBD de RXR (Perlmann T. et *al.*, 1993). Cependant, une partie des acides aminés formant la boucle du premier doigt de zinc est nécessaire et suffisante pour l'hétérodimérisation avec RXR. Cette région est appelée la **boîte DR** (pour répétition directe). Elle joue un rôle crucial dans la reconnaissance des éléments de réponse de type DR en fonction de leur espacement, en interaction avec la région D de RXR (Zechel C. et *al.*, 1994). Dans TR cette région se localise dans la partie N-terminale du domaine A/B. La présence de ces deux régions caractéristiques, D et DR, entraîne entre RAR ou TR et RXR une interaction asymétrique. Le mécanisme de dimérisation entre les récepteurs pour l'activation de la transcription implique différentes régions du domaine de liaison à l'ADN spécifiques selon le récepteur nucléaire mais aussi selon le type d'élément de réponse présent et l'espacement entre les demi-sites de liaison.

1.2. Les éléments de réponse

La liaison à l'ADN s'effectue au niveau d'une région précise de l'ADN (élément de réponse : HRE) localisée dans la région promotrice des gènes cibles. La plupart des éléments de réponse des récepteurs stéroïdiens sont composés d'un ou deux hexamères 5'-PuG(G/A)(T/A)CA-3' en répétition directe ou inversée.

1.2.1. Classification des récepteurs selon leur liaison à l'ADN

Les récepteurs nucléaires de la superfamille sont généralement divisés en quatre classes selon leurs propriétés de dimérisation et de liaison à l'ADN (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1995).

- La classe I inclut les récepteurs des hormones stéroïdiennes pour lesquels le ligand induit la formation d'homodimères et la liaison à l'ADN au niveau de deux demi-sites en répétition inversée (ou palindromique) séparés de 3 nucléotides. Cette classe comprend GR, MR, PR, AR et ER. Ces récepteurs forment en général des complexes avec l'hsp90. La fixation du ligand est nécessaire pour induire un changement allostérique permettant la dissociation des protéines de choc thermique et facilite la liaison à l'ADN.

- Les récepteurs de la classe II hétérodimérisent avec RXR et lient en général des répétitions directes. Ce sont les TRs, RARs, VDR, PPARs et EcRA ainsi que tous les récepteurs ligand-dépendants. Les récepteurs de la classe II sont également capables de se lier à l'élément de réponse en l'absence de ligand (Damm D.S. et *al.*, 1989, Sap J. et *al.*, 1989, De Thé H. et *al.*, 1990).

- Dans la classe III sont regroupés les récepteurs liant principalement des séquences en répétition directe sous forme d'homodimères tels que RXR, COUP/ARP et HNF-4. Ce sont pour la plupart des récepteurs orphelins.

- La dernière classe, la classe IV, rassemble les récepteurs se fixant au niveau d'un seul demi-site sous forme de monomères. NGF1-B(CEB-1) et ELP/SF-1 qui sont des récepteurs orphelins appartiennent à cette classe.

1.2.2. Polymorphisme des HREs

Les premières séquences d'ADN spécifiques des récepteurs stéroïdiens caractérisées ont été les éléments de réponse palindromiques contenant deux demi-sites de 5 à 6 paires de bases séparés par 3 pb (Evans R.M., 1988, Green S. et Chambon P., 1988). Bien que les séquences inversées liant les GR, PR, MR et AR soient plus ou moins des copies parfaites des motifs consensus 5'-AGAACA-3' (ou 5'-TGTTCT-3' pour l'autre demi-site), ER reconnaît un élément de réponse de type palindromique espacé de 3 pb 5'-GGTCA-3' souvent précédé d'une purine (Klock G. et *al.*, 1987, Martinez E. et *al.*, 1987). Les TRs, les RARs peuvent reconnaître un élément palindromique synthétique, le TRE pal, sans espacement entre les demi-sites : PuGGTCA (Glass C.K. et *al.*, 1988, Graupner G. et *al.*, 1989, Umesono K. et *al.*, 1988). Cependant, naturellement les TREs et les RAREs se présentent sous forme de répétitions directes. Les RAREs sont retrouvés dans les promoteurs de h/mRAR β 2 et de RAR α 2 (Zelent A. et *al.*, 1991, Leroy P. et *al.*, 1991), le promoteur du gène de la mCRBPI (Smith W.C. et *al.*, 1991), du gène de l'alcool déshydrogénase III (Duester G. et *al.*, 1991), du facteur H du complément de souris (Munoz-Canoves P. et *al.*, 1990), de la laminine B1 de souris (Vasios G. et *al.*, 1991), etc. Ce motif est également impliqué dans l'activation transcriptionnelle *via* les RXRs. Cependant les RXRs et les RARs agissent différemment. Les RXRs reconnaissent préférentiellement les répétitions directes espacées d'une seule paire de bases alors que les RARs lient plus spécifiquement des répétitions directes espacées de 5 pb (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1991a).

2. L'hétérodimérisation avec RXR

Différents laboratoires ont prouvé que les RARs et les RXRs formaient des hétérodimères (Leid M. et *al.*, 1992, Kliewer S.A. et *al.*, 1992, Yu V.C. et *al.*, 1991). En fait, l'activité transcriptionnelle dépendante des RARs nécessite la présence des RXRs. C'est le complexe hétérodimérique RXR/RAR qui se lie à l'élément de réponse de l'ADN (Leid L. et *al.*, 1992). De plus, curieusement, l'activité transcriptionnelle passant par les homodimères RXRs peut quelquefois être inhibée par la présence de RARs (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1991). RXR s'hétérodimérise également avec d'autres récepteurs nucléaires comme TR, GR, VDR, PPAR ou des récepteurs orphelins (Zhang X-K. et *al.*, 1992, Yu V.C. et *al.*, 1991, Kliewer S.A. et *al.*, 1992 a, b, Marks M.S. et *al.*, 1992). En général, les hétérodimères RXR/RAR ou RXR/TR interagissent plus efficacement avec des éléments de réponse à répétitions directes

plutôt que sur des séquences palindromiques ou palindromiques inversées (Kurokawa R. et *al.*, 1993, Mader S. et *al.*, 1993). Des hétérodimères RXR/RAR lient préférentiellement des éléments de réponse de type DR-2 ou DR-5 *in vitro* alors que les hétérodimères RXR/TR sont plus spécifiques des éléments de réponse de type DR-4 et DR-3. Cette reconnaissance sélective des éléments de réponse à répétitions directes espacés de 1 à 5 nucléotides a été formalisée par la règle de "1-5" (Mangelsdorf D.J., 1994).

2.1. La règle 1-2-3-4-5

En général, l'activation par les RARs et les RXRs s'accomplit grâce aux éléments de réponse sous forme de répétitions directes 5'-AGGTCA-3' espacées par un nombre défini de nucléotides (pour revue : Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1994). Par des expériences de transactivation et de liaison à l'ADN *in vitro* sur des HREs en répétitions directes, Umesono K. et *al.*, ont établi la règle des 3-4-5 correspondant au nombre de nucléotides séparant les deux demi-sites de liaison. Le VDR lie préférentiellement un DR-3, les TRs un DR-4 et les RARs un DR-5 (Umesono K. et *al.*, 1991). Cette règle fournit l'explication pour le type de réponse selon un VDR, TR ou RAR et conduit à l'application de cette stratégie aux autres membres de la famille des récepteurs nucléaires. Ainsi, un RXRE correspondant à 4 arrangements de séquences répétées séparées par un seul nucléotide (DR-1) a été identifié (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1991). Cet élément DR-1 est aussi une cible pour PPAR et COUP (Kliwer S.A. et *al.*, 1992 a, b). D'autres groupes ont mis en évidence une seconde classe de RARE présentant un motif DR-2 (Smith W.C. et *al.*, 1991, Durand B. et *al.*, 1992). L'importance du nombre de nucléotides entre les deux demi-sites de l'élément de réponse déterminant une spécificité optimale pour les gènes cibles des RARs et des autres membres de la famille est démontrée par le nombre de gènes contenant des HREs selon la règle 1-2-3-4-5 (fig. 31).

2.2. Les hétérodimères RAR/RXR

En réalisant différents mutants, Zechel C. et *al.*, ont caractérisé deux interfaces possibles de dimérisation entre RAR et RXR et entre TR et RXR. Sur un DR-5 ou un DR-4, la région N-terminale du doigt CI de RAR ou de TR entre en contact avec la partie C-terminale de la région CII de RXR (boîte D) (Zechel C. et *al.*, 1994 a) (fig. 32). Sur un élément de réponse DR-2, la boîte T de RAR interagit avec la région CII de RXR excepté

Répétitions directes : règle 1-2-3-4-5

	RXRE		
	→	1	→
DR-1	AGGTCA	G	AGGTCA
CRBP II	AGGTCA	C	AGGTCA
hApoAI	AGGGCA	A	GGGTCA
cOVAL	GTGTCA	A	AGGTCA
	RARE II		
	→	2	→
DR-2	AGGTCA	AG	AGGTCA
mCRBPI	AGGTCA	AA	AGGTCA
mCRABPII	AGTTCA	CC	AGGTCA
hApoAI	GGGTCA	AG	GGTCA
	VDRE		
	→	3	→
DR-3	AGGTCA	AGG	AGGTCA
rOST	GGGTGA	ATG	AGGACA
hOST	GGGTGA	ACG	GGGGCA
mSPP-1	GGTTCA	CGA	GGTTCA
	TRE		
	→	4	→
DR-4	AGGTCA	CAGG	AGGTCA
rMH	AGGTGA	CAGG	AGGACA
rME	GGGTTA	GGGG	AGGACA
MLV	GGGTCA	TTTC	AGGTCC
	RARE I		
	→	5	→
DR-5	AGGTCA	CCAGG	AGGTCA
mRARβ	GGTTCA	CCGAA	AGGTCA
mCP-H	AGGTCA	CTGAC	AGGGCA
hADH3	GGGTCA	TTCAG	AGTCA

Palindromes

	→	←
TRE-pal	AGGTCA	TGACCT
TRE-pal 3 (ER)	AGGTCA _n nnnTGACCT	

Palindrome inversé

	←	8	→
RARE (ER8)	TGACCT _n nnnnnnnnAGGTCA		

Fig. 31 : Exemples d'éléments de réponse

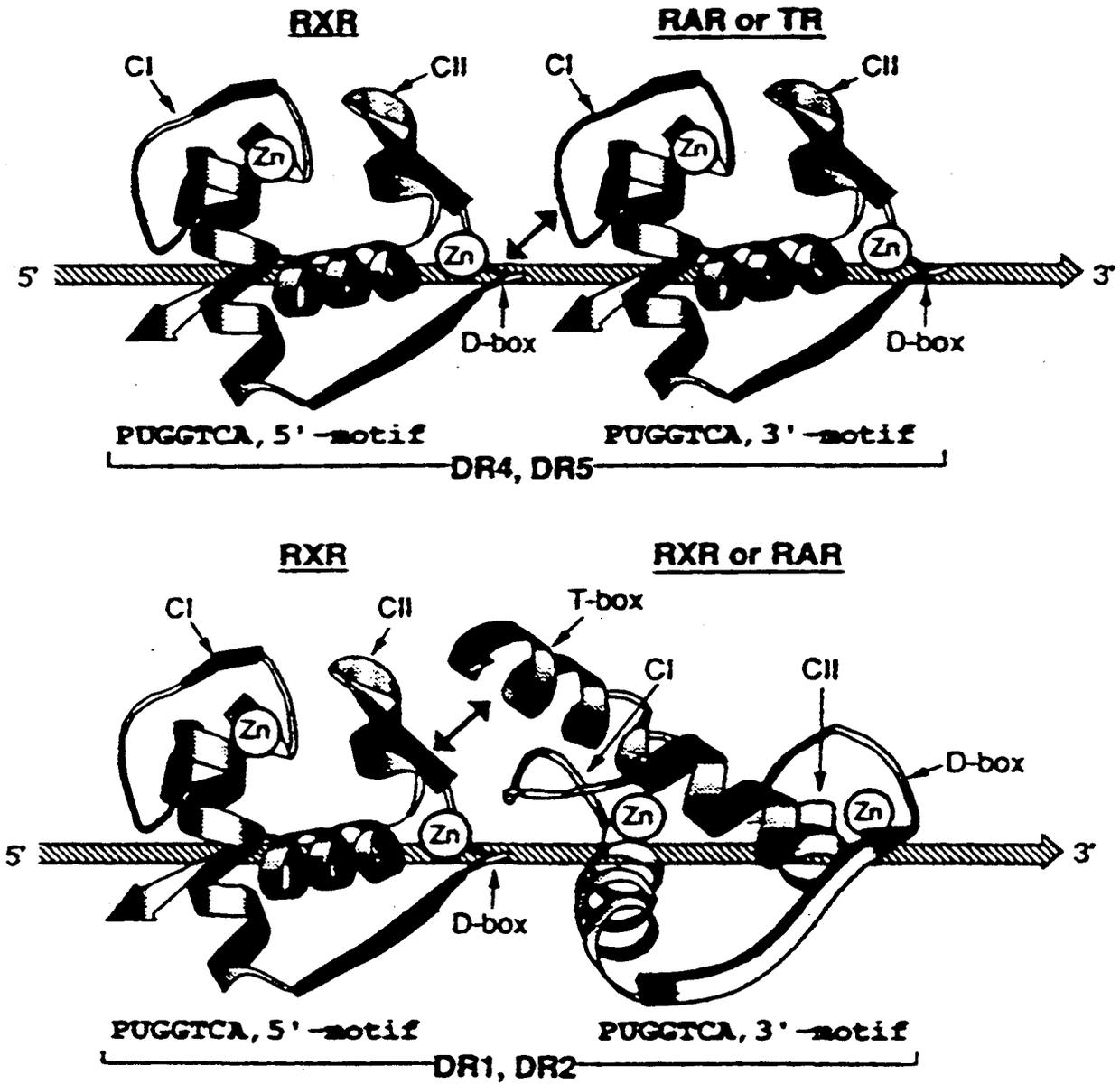


Fig. 32 : Modèles des hétérodimères RXR/RAR ou RXR/TR sur leurs éléments de réponse (Zechel C. et al., 1994)

avec la boîte D. Les homodimères RXRs fixés sur des éléments de réponse de type DR-1 adoptent la même conformation de dimérisation (Zechel C. et *al.*, 1994 b). En se basant sur la structure tridimensionnelle du GR-DBD, il apparaît que RXR se positionne toujours en 5' de RAR dans la formation des complexes aussi bien sur un DR-5 que sur un DR-2. Il a été montré que l'hétérodimère RXR/RAR pouvait également se fixer sur un élément de réponse de type DR-1. Cependant, dans ce cas, RXR peut se positionner en 3' comme en 5' sur le site d'ADN (Kurokawa R. et *al.*, 1994). Ainsi, la présence de plusieurs surfaces de dimérisation indépendantes dans le domaine C de RXR et de RAR, pouvant former différentes liaisons coopératives en fonction de l'élément de réponse de type DR, est un paramètre important contribuant à la complexité d'action des rétinoïdes. Dans le domaine de liaison au ligand, il existe également des éléments structuraux impliqués dans la dimérisation tels que la boîte I de RXR constituée de 40 acides aminés situés dans la partie C-terminale de ce domaine et 11 de ces acides aminés sont essentiels à l'hétérodimérisation avec HNF4 dont Ala 416 et Arg 421 (Lee S.K. et *al.*, 1998).

3. Le rôle du ligand dans l'activation transcriptionnelle

3.1. La fixation du ligand dans l'hétérodimère RXR/RAR

Le groupe de Pfahl (La Vista-Picard N. et *al.*, 1996) a observé qu'un hétérodimère donné pouvait être activé différemment en fonction de la concentration en *t*-RA ou de 9*c*-RA sur divers RAREs. Certains rétinoïdes synthétiques avec une conformation rigide améliorent cette activation préférentielle des hétérodimères sur des éléments de réponse sélectifs. De plus, différents hétérodimères sont activés de façon séquentielle et/ou synergique par des rétinoïdes spécifiques de RAR ou de RXR. Cet effet coopératif est obtenu pour les hétérodimères RXR α /RAR α et RXR α /RAR β . Ces observations décrivent un nouveau principe de l'interaction récepteur-ligand et montrent que la réponse induite par le ligand n'est pas déterminée par le récepteur seul mais par les récepteurs hétérodimérisés complexés à l'ADN.

Cependant, le rôle fonctionnel de chaque récepteur dans l'hétérodimère n'est pas encore clairement défini et les résultats restent discordants. D'une part, des études montrent que dans des cellules transfectées avec les vecteurs d'expression de RAR et de RXR, les ligands spécifiques des RXRs sont inefficaces pour l'activation de la transcription (Lehmann

et *al.*, 1992, Kurokawa R. et *al.*, 1994, Forman et *al.*, 1995 a). Kurokawa et *al.* ont alors davantage étudié le mécanisme possible de l'inefficacité des ligands spécifiques des RXRs dans la transactivation *in vitro* via les hétérodimères RXR/RAR, en utilisant des ligands spécifiques de RXR, le LG1069 et le 9c-RA (Kurokawa R. et *al.*, 1994). Ces investigations ont conduit à la conclusion que dans l'hétérodimère, RAR inhibe de façon allostérique la fixation du ligand sur RXR. Cette inhibition est seulement observée quand l'hétérodimère est associé à son élément de réponse. Le même résultat est proposé par Forman B.M. et *al.* Ils suggèrent cependant que RAR inhibe la fixation du ligand sur RXR dans les hétérodimères RXR/RAR seulement lorsque RAR n'est pas lié à son ligand. Dès que le ligand se fixe à RAR, l'inhibition est levée et RXR est capable de se lier à son propre ligand (Forman B.M. et *al.*, 1995). Dans cette vision des faits, Botling J. et *al.*, ont montré que l'activité de RXR était dépendante de l'identité et de l'état de liaison au ligand du récepteur partenaire (Botling J. et *al.*, 1997). Ils ont également constaté que l'inhibition de RXR par RAR pouvait être levée par la liaison d'un ligand antagoniste de RAR.

D'autre part, ces résultats sont controversés par différentes études montrant que dans les cellules où RAR et RXR sont coexprimés, le 9c-RA induit plus fortement la transactivation que *t*-RA (Zhang X-K. et *al.*, 1992, Lee M.O. et *al.*, 1995, Chen J.Y. et *al.*, 1995). Comme le 9c-RA interagit avec les deux types de récepteur alors que le *t*-RA lie exclusivement RAR, ces observations suggèrent que la liaison du ligand par les unités RXR et RAR dans l'hétérodimère est nécessaire pour une transactivation élevée. Il a également été rapporté que l'activation par des ligands sélectifs des RARs et des RXRs s'effectue indépendamment et de façon additionnelle (Durand B. et *al.*, 1994). Ceci indique que les hétérodimères RXR/RAR sont activés par les ligands des deux types de récepteur. Ces résultats convergent avec ceux d'Apfel C.M. et *al.*, qui montrent qu'en présence de ligands spécifiques de RAR et de RXR le complexe RXR/RAR-DR-5 active la transcription dans des cellules transfectées (Apfel C.M. et *al.*, 1995). Kersten S. et *al.*, en utilisant des méthodes basées sur la fluorescence montrent que l'hétérodimérisation avec RAR n'altère pas la capacité de liaison de RXR. De même, ni l'association de l'hétérodimère RXR/RAR à son élément de réponse, ni une concentration saturante en ligand spécifique de RAR n'affecte l'affinité de liaison de RXR dans l'hétérodimère. Ces données indiquent davantage que l'affinité de RAR pour 9c-RA est considérablement plus importante comparée à celle de RXR et que cette différence d'affinité est conservée dans l'hétérodimère RXR/RAR. Selon cette équipe, la liaison au RAR et au RXR se fait donc de façon indépendante au sein de

l'hétérodimère (Kersten S. et *al.*, 1996). Ces hypothèses sont vérifiées par les résultats obtenus par Vivat V. et *al.* sur RXR α . Ainsi, la mutation de la phénylalanine 318 en alanine sur RXR α génère un récepteur constitutif et cette activité constitutive peut-être retrouvée au sein de l'hétérodimère RXR/RAR non muté en présence d'un ligand agoniste ou d'un ligand antagoniste de RAR, le BNS614. Ces résultats suggèrent, que dans l'hétérodimère, RAR peut adopter une structure différente de celle de l'holoRAR actif permettant à RXR de devenir transcriptionnellement actif en présence d'agoniste (Vivat V. et *al.*, 1997). Ainsi, pour l'heure, les résultats sur les propriétés de liaison du ligand et de transactivation des récepteurs sous forme d'hétérodimères semblent confirmer le rôle actif de RXR (Chen J-Y. et *al.*, 1996, Clifford J. et *al.*, 1996, Roy B. et *al.*, 1995, Minucci S. et *al.*, 1997).

3.2. Régulation du mécanisme d'hétérodimérisation de RXR

RXR α en solution forme des tétramères avec une forte affinité de liaison grâce à la région C-terminale contenant deux résidus consécutifs de phénylalanine essentiels (Kersten S. et *al.*, 1995 a, 1997). L'interaction de RXR avec son ligand, le 9c-RA, dissocie ce complexe tétramérique en monomère (Kersten S. et *al.*, 1995 b) avec une coopérativité positive (Kersten S. et *al.*, 1995 c) et favorise en absence d'ADN, l'hétérodimérisation avec RAR α (RAR existant seulement sous forme monomérique en solution). Ces tétramères en absence de ligand peuvent également lier l'ADN au niveau d'éléments de réponse de type DR-1 (Lin B.C. et *al.*, 1997, Chen Z.P. et *al.*, 1998). De plus, la liaison du 9c-RA n'affecte pas la stabilité des homodimères sur l'élément de réponse DR-1 et des hétérodimères RXR/RAR sur un DR-5. Ces données ont permis d'établir un modèle *in vitro* dans lequel les tétramères de RXR peuvent servir à deux fonctions : soit rapidement fournir une grande quantité d'hétérodimères RXR en présence de 9c-RA, soit former des homodimères RXR liés à des HREs en absence de 9c-RA. Ces événements pourraient représenter un mécanisme de régulation ligand-dépendant contrôlant la disponibilité de RXR (Chen Z.P. et *al.*, 1998).

3.3. Les régions de l'activation transcriptionnelle

Deux régions des récepteurs nucléaires possèdent spécialement des fonctions de transactivation, l'AF-1 et l'AF-2 (AF pour "activating function") (Hollenberg A.N. et *al.*, 1995).

- L'AF-1

L'AF-1 est localisée dans la partie N-terminale du récepteur au niveau du domaine A/B. Elle existe chez RAR α , β et γ mais seulement chez RXR α et β (Nagpal et *al.*, 1993). Les acides aminés de cette région ne sont pas très conservés entre les récepteurs nucléaires. L'activation transcriptionnelle d'AF-1 est constitutive mais peut être synergique de l'AF-2 selon le promoteur et le RARE utilisés (Nagpal et *al.*, 1992, Folkers et *al.*, 1993).

- L'AF-2

Elle a été identifiée en premier lieu chez le récepteur des oestrogènes (Kumar V. et *al.*, 1987). Le domaine de l'AF-2 (encore appelé τ c) est localisé dans la partie C-terminale du domaine de fixation du ligand au niveau de l'hélice 12. Sa fonction est induite par la liaison du ligand et varie selon l'élément de réponse impliqué (Durand B. et *al.*, 1994). Cette région est très conservée et comprend les acides aminés essentiels à la forte affinité de liaison du 9 α -RA par les RARs et les RXRs (Tate B.F. et *al.*, 1994, 1995, 1996, Leng X. et *al.*, 1995). Son mécanisme d'action serait donc le suivant : la liaison d'un ligand agoniste entraînerait un changement de conformation du domaine E du récepteur nucléaire pour donner une structure similaire de l'holoRAR γ -LBD (Renaud J.P. et *al.*, 1995). De cette façon, H12 est déplacée vers l'intérieur du site de liaison créant une surface d'interaction possible avec les facteurs de la transcription et le domaine de l'AF-2. Récemment, la mutation d'un résidu de tyrosine conservé se localisant dans l'AF-2 de ER a permis de mettre en évidence un mécanisme constitutif d'activation de la transcription (tout comme la mutation Phe 318Ala dans RXR α (Vivat V. et *al.*, 1997)). Ainsi, cette mutation entraîne un changement de conformation au niveau du domaine E permettant la liaison de coactivateurs indépendamment de la fixation du ligand (White R. et *al.*, 1997). Cependant, il faut noter que la fixation d'un antioestrogène abolit cette activation (Tremblay G.B. et *al.*, 1998). L'activité AF-2 requière aussi des acides aminés des hélices 3 et 4, du fait de leur proximité de H12 dans la structure tridimensionnelle. C'est le cas de Lys 366 dans l'hélice 3 de ER (conservée chez les autres membres des récepteurs nucléaires) qui semble nécessaire à l'activité transcriptionnelle (Henttu P.M.A. et *al.*, 1997) et au recrutement de coactivateurs, mais aussi de Gln 252 dans TR β 1 qui se trouve dans la boucle Ω (entre H2 et H3) (Bhat M.K. et *al.*, 1997).

3.4. Régulation de la transcription par l'intermédiaire des résidus de la boîte L

La région 403-410 du domaine E de RAR α localisée entre H11 et la région AF-2 correspondant à la boîte L semble nécessaire à la reconnaissance spécifique de différents ligands mais aussi aux interactions protéine-protéine (Lefebvre B. et *al.*, 1998). La mutagenèse dirigée de ces résidus entraîne des conséquences dépendantes du ligand utilisé. Certaines de ces mutations (Gly404Pro et Ser405Ala) en présence de CD367 dissocient l'activation ligand dépendante de l'activité anti AP-1 de hRAR α . De plus, les interactions protéine-protéine qui s'effectuent au contact de cette même région semblent très sensibles aux altérations structurales. Ainsi, les mutations qui n'affectent ni la liaison au ligand, ni la liaison à l'ADN, ni la transactivation, inhibent la liaison de corépresseurs sur RAR α . Ces données suggèrent donc que le LBD de hRAR α peut adopter différentes conformations sous le contrôle de la boîte L et que la structure du ligand est un paramètre critique pour le positionnement des hélices 1 et 12 de l'holoLBD.

4. Mécanisme moléculaire de la transcription

L'activité transcriptionnelle chez les Eucaryotes au cours du développement ou en réponse à un signal extracellulaire est un processus complexe impliquant l'action concertée de différentes protéines. L'ARN polymérase II est l'enzyme responsable de la production d'ARNm. Elle agit en combinaison avec un certain nombre de facteurs de transcription. Ces facteurs peuvent être divisés en trois classes selon leur fonction. La première classe correspond aux facteurs de la transcription basale (TFIID ou TBP, TFIIB, TFIIF, TFIIIE, TFIIH dans l'ordre de leur intervention). La seconde classe regroupe les facteurs de transcription spécifiques d'une séquence d'ADN nécessaires à la régulation de la transcription. Le dernier groupe comprend les coactivateurs qui régulent la transcription. Il a été montré que RXR, par l'intermédiaire de son domaine AF-2, se lie à la protéine de liaison de la boîte TATA (TBP) et à TAFII110 dans le complexe TFIID de façon ligand-dépendante (Schulman I.G. et *al.*, 1995). RAR et certains récepteurs se lient plutôt à TFIIB (Blanco J et *al.*, 1995, Hazdic E. et *al.*, 1995, Leong G.M. et *al.*, 1998).

4.1. Les cofacteurs

Les interactions des récepteurs nucléaires avec leurs éléments de réponse ou avec la machinerie transcriptionnelle sont réglées, notamment, par des protéines appelées cofacteurs dont la présence inhibe (corépresseur) ou augmente (coactivateur) l'activité du récepteur (fig. 33). L'existence de tels cofacteurs a été suggérée par deux types d'observation : 1) l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires dépend de leur environnement cellulaire ; 2) l'activation de certains récepteurs stéroïdiens est inhibée par l'activation simultanée de récepteurs de la même famille ce qui a suggéré un phénomène de séquestration d'éventuels effecteurs nucléaires. Il est difficile de définir avec précision la notion de cofacteur car leur mode d'action reste encore très mal connu.

4.1.1. Les coactivateurs

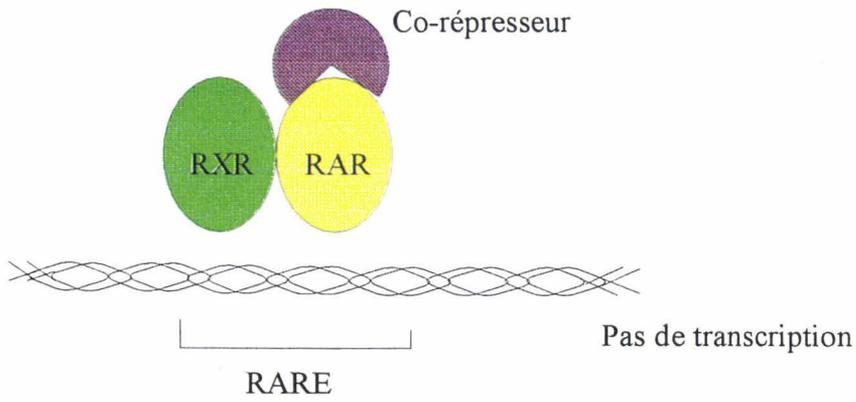
Ils agissent sur les récepteurs nucléaires liés à leur ligand agoniste et impliquent la région AF-2. Certains de ces coactivateurs (RIP-140, SRC-1 et CBP) possèdent un motif de séquence Leu X X Leu Leu nécessaire et suffisant à leur liaison au récepteur (Heery D.M. et *al.*, 1997)

- **SRC-1/p160** : la molécule SRC-1 (steroid coactivator) a été identifiée dans le système double hybride, sur la base de son interaction avec le domaine de liaison au ligand du hPR, en présence du ligand (Onate S.A. et *al.*, 1995). SRC-1 est synthétisée dans différents tissus et agit de manière pléiotropique : elle augmente l'activité transcriptionnelle de PR mais aussi des ERs, GRs, TRs et des RXRs quand ceux-ci sont fixés sur leurs éléments de réponse et sont en présence de leur ligand respectif.

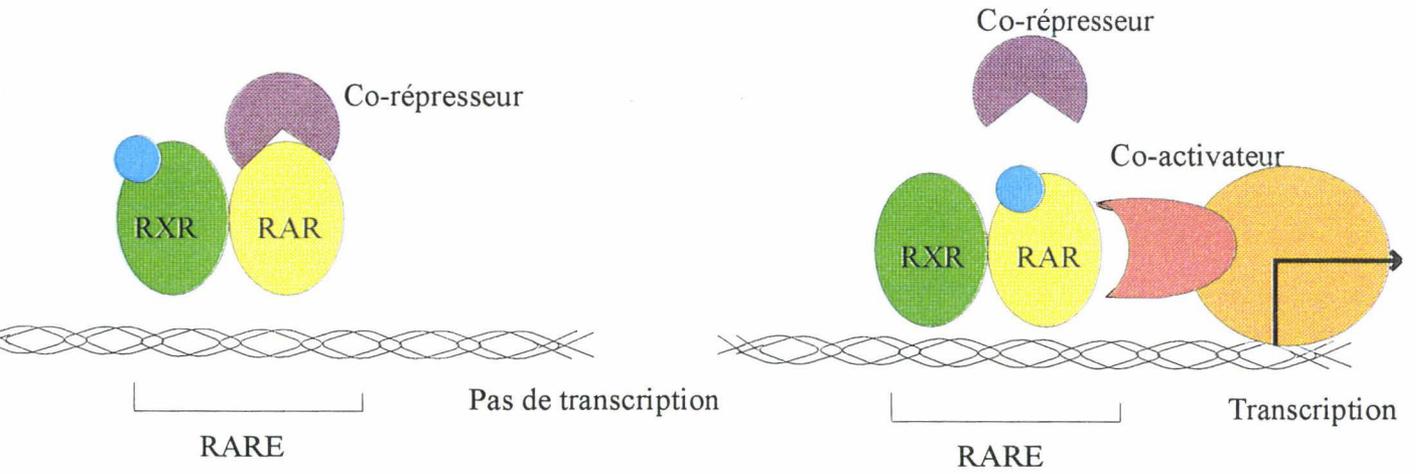
- **TIF-2** (transcriptional intermediary factor) agit avec de nombreux récepteurs nucléaires (AR, ERs, GRs, PR, RARs, RXRs, TRs et VDR) en présence de leur ligand. Cependant, il n'amplifie l'activité transcriptionnelle que des ARs, ERs et PR et pas celle des GRs, RARs, RXRs, TRs ni VDR (Voegel J. et *al.*, 1996, 1998).

- **CBP et p300** (CREB-Binding protein). CBP se lie directement au récepteur nucléaire au niveau des 101 acides aminés N-terminaux (Kamei Y. et *al.*, 1996) et peut interagir simultanément avec p160/SCR-1 et RAR, ER ou PR en présence de leur ligand (Yao

Sans ligand



Un ligand



Deux ligands

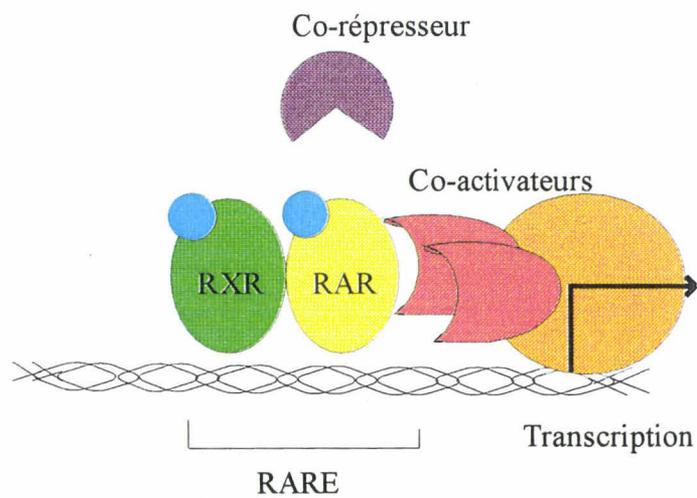


Fig. 33 : Régulation de la transcription par les cofacteurs (Minucci S. et Ozato K., 1996)

T.P. et *al.*, 1996). Cette interaction tripartite donne lieu à un complexe vraisemblablement plus stable et ayant une activité transcriptionnelle accrue. De plus, en s'associant avec p300/CBP, le récepteur nucléaire établit des contacts avec la machinerie transcriptionnelle puisque CBP/p300 peut interagir avec la TBP et d'autres molécules qui lui sont associées (TAF).

- **ERAP et RIP** (estrogen receptor-associated proteins et receptor-interacting protein). Les protéines ERAP140 et 160 (Halachni S. et *al.*, 1994), d'une part, et les protéines RIP80, 140 et 160 (Cavaillès V. et *al.*, 1994, 1995, L'Horset F. et *al.*, 1996), d'autre part ont été isolées sur la base de leur interaction avec ER, RIP 140 interagit au moins en deux sites distincts, en N- et en C-terminal, du récepteur. RIP13 et RIP110 interagissent avec TR, RAR, RXR mais pas avec GR (Seol W. et *al.*, 1995).

- **TIF-1** (transcriptional intermediary factor). TIF-1 augmente l'activité transcriptionnelle du domaine de fixation au ligand de RXR γ et de RAR α (Le Douarin B. et *al.*, 1995) et interagit avec les domaines de fixation au ligand de VDR, ER et PR en présence de leur ligand respectif (Thénot S. et *al.*, 1997).

- **Trip1 et mSUG1** (TR-interacting protein). Ce sont deux coactivateurs identiques à 99.3% (Lee J.W. et *al.*, 1995, Vom Baur E. et *al.*, 1996). Trip1 interagit avec Tra1 et RXR. SUG1 interagirait également avec les protéines TBP et TAFII30, établissant un pont entre les récepteurs et la machinerie transcriptionnelle.

- **Analogues humains de SNF2/SWI2 de levure**. Ces molécules s'appellent hbrm (Muchardt C. et Yaniv L. 1993), hsnf2L (Okabe I. et *al.*, 1996), BRG1 (Khavari P.A. et *al.*, 1993) pour GR ou encore SNF2 α et SNF2 β (Chiba H. et *al.*, 1994) pour ER et RAR.

- **RAP46** (receptor associated protein). Cette protéine possède la plus forte affinité pour ER mais elle peut également interagir avec AR, TR et PR (Zeiner M. et Gehring U. 1995).

4.1.2. Les corépresseurs

Ils interagissent avec les récepteurs en absence de ligand au niveau de la région charnière D.

- **N-CoR** (nuclear receptor co-repressor) ou p270 ou TRAC. La protéine N-CoR a été récemment isolée sur la base de son interaction avec le complexe TR/RXR/ADN en l'absence de ligand (Hörlein A.J. *et al.*, 1995). Quand le complexe N-CoR/TR/RXR est fixé sur un élément de réponse de type DR-5, le ligand induit une dissociation de N-CoR du complexe et le recrutement de deux protéines de 140 et 160 kDa. La transcription peut alors avoir lieu. En revanche, quand l'hétérodimère N-CoR/TR/RXR est fixé sur un élément de réponse de type DR-1, N-CoR ne se dissocie pas et aucune activité transcriptionnelle n'est observée (Kurokawa R. *et al.*, 1995). Ce résultat est à rapprocher de la démonstration de l'hétérodimère RAR/RXR qui a une activité transcriptionnelle sur un élément de réponse de type DR-5, mais n'en a pas sur un élément de réponse de type DR-1 en raison d'une inversion de l'ordre des récepteurs sur l'ADN et de l'impossibilité pour RXR de fixer son ligand dans la configuration DR-1 (Kurokawa R. *et al.*, 1994). N-CoR interagit également avec la partie carboxy-terminale de RAR (Hörlein A.J. *et al.*, 1995).

- **SMRT** (silencing mediator for retinoid-and thyroid-hormone receptors). Ce facteur interagit avec RAR et TR en l'absence de ligand (Don Chen J. *et al.*, 1993, Don Chen J. et Evans R.M., 1995) mais pas avec GR. SMRT reste fixée sur le RAR ou le TR même quand ceux-ci sont liés, sous forme d'hétérodimères, à leurs éléments de réponse. Lors de la fixation du ligand, les complexes SMRT/RAR ou SMRT/TR se dissocient, ce qui constitue vraisemblablement une étape nécessaire pour que s'exerce l'activité transcriptionnelle (Li H. *et al.*, 1997).

- **TRUP** (thyroid hormone receptor uncoupling protein). TRUP réprime l'activité transcriptionnelle de TR ainsi que celle de RAR mais pas celle de RXR et de ER, en inhibant la fixation des dimères TR/RXR et RAR/RXR, respectivement sur les éléments de réponse DR-4 et DR-5 (Burris T.P. *et al.*, 1995). Il n'est cependant pas exclu que TRUP agisse même en amont, en interférant avec la dimérisation de RXR.

Un travail important reste donc à continuer pour déterminer la spécificité et l'affinité de ces cofacteurs vis-à-vis de chaque récepteur nucléaire ainsi que des autres facteurs transcriptionnels de la cellule. Cependant, il est désormais possible de spéculer sur le mode d'action pour un bon nombre d'antagonistes des récepteurs nucléaires : par leur fixation, ils induisent sans doute chez le récepteur une conformation lui interdisant d'interagir avec un cofacteur sans lequel son activité transcriptionnelle reste très faible, voire nulle. Enfin, dans la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques, ces cofacteurs représentent bien évidemment de nouvelles cibles pharmaceutiques de choix.

4.2. La phosphorylation des récepteurs nucléaires

La phosphorylation des facteurs de transcription peut jouer un rôle dans la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN (de façon positive ou négative), les interactions avec d'autres protéines et la transactivation (Weigel N. L. 1996). La découverte que les récepteurs stéroïdiens peuvent être activés par stimulation de la voie des kinases en absence d'hormones et que cette voie peut altérer la réponse d'antagonistes, confirme l'importance de la phosphorylation dans l'activité des récepteurs (Tahayato A. et *al.*, 1993, Lefebvre P. et *al.*, 1995). De plus, la phosphorylation des régions AF-1 et AF-2 de RAR par les kinases est nécessaire pour permettre aux RARs d'induire la différenciation des cellules F9 en présence d'acide rétinoïque (Taneja R. et *al.*, 1997). En outre, récemment, il a été démontré que les récepteurs nucléaires activés par leur ligand empêchent la phosphorylation de c-Jun sur les sérines 63 et 73 et par conséquent l'activation AP-1 en bloquant l'induction en cascade des kinases (JNK). De plus, ces récepteurs nucléaires auraient un effet antagoniste sur d'autres facteurs de transcription activés par JNK tels que Elk-2 et ATF-2. Ce mécanisme est basé sur l'étape de blocage de l'activation AP-1 qui est nécessaire à l'interaction du cofacteur CBP (Caelles C. et *al.*, 1997).

La régulation de la transcription d'un gène correspond donc à un mécanisme fin et complexe, mettant en jeu notamment les différentes affinités des récepteurs pour les cofacteurs et différentes voies de signalisation.

Résultats

et

Discussion

Pour appréhender les mécanismes d'interaction des récepteurs de l'acide rétinoïque avec leurs ligands, nous avons ciblé notre étude sur l'implication plausible de résidus d'acides aminés du domaine de liaison au ligand. Ce travail s'inscrit dans la continuité de celui réalisé au cours de notre D.E.A. En effet, pendant cette première année de recherche, nous avons réalisé des expériences d'inactivation de la liaison RAR-ligand grâce à des réactifs spécifiques d'acides aminés : le pyridoxal 5' phosphate (PLP) spécifique des lysines, le phénylglyoxal (PG) pour modifier les résidus d'arginine et le tétranitrométhane (TNM) qui nitre les résidus de tyrosine. Cette étude a été réalisée sur les trois RARs : α , β et γ en présence de *t*-RA et du CD367. Nous avons alors constaté pour chacun des récepteurs avec les trois réactifs, une inactivation dose-dépendante de la liaison des deux ligands. Or, le TNM s'est avéré être le réactif le plus efficace. Ce résultat suggérait donc l'implication d'un ou de résidus de tyrosine dans l'interaction RAR-ligand. Il nous semblait alors intéressant dans un premier temps d'identifier le ou les résidus de tyrosine pouvant être impliqué(s) dans la liaison du ligand de RAR α . Pour cela, nous avons utilisé une méthode d'approche biochimique indirecte, la spectrométrie de masse. De cette façon, nous avons suspecté la tyrosine 277 d'être impliquée dans la liaison avec *t*-RA. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé les mutations des tyrosines du domaine E de RAR α et analysé l'activité de liaison et de transactivation de ces mutants. Nous avons alors vérifié que la tyrosine 277 joue un rôle important dans la liaison de différents ligands et particulièrement dans l'activation de RAR α . Les autres résidus de tyrosine ne se trouvent pas dans la poche de liaison au ligand et ne participent donc pas à la liaison du ligand.

Dans une seconde partie de notre travail, nous avons étudié la topographie des acides aminés du site actif. En nous basant sur la structure cristallographique du LBD-hRAR γ , nous sommes intéressés, dans le cadre d'une collaboration avec le CIRD Galderma (Centre International de Recherche Dermatologique), aux résidus potentiellement impliqués dans la LBP. Quatre résidus d'acides aminés nous ont semblé particulièrement intéressants à étudier. Nous les avons donc mutés et nous avons étudié leur rôle dans la liaison de différents ligands agonistes et antagonistes ainsi que dans l'activation de RAR α .

I. IDENTIFICATION D'UN RESIDU DE TYROSINE DU DOMAINE E DE RAR α IMPLIQUE DANS LES MECANISMES DE LIAISON AUX LIGANDS ET DE TRANSACTIVATION

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise à "Journal of Biological Chemistry". Au préalable des expériences ont été réalisées, permettant d'étudier de façon indirecte le comportement différentiel des récepteurs en fonction des ligands fixés. Les résultats ainsi obtenus, nous ont permis de mettre au point une stratégie d'étude sur les résidus de tyrosine du domaine E de RAR α .

1. Inactivation du site de liaison par des réactifs spécifiques d'acides aminés

1.1. Stratégie utilisée

Au cours de travaux précédents menés au laboratoire, N. Dallery avait mis en évidence une sensibilité de l'activité de liaison au ligand de hRAR α recombinant, aux réactifs spécifiques des thiols (Dallery N. *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent qu'un (ou des) résidu(s) de cystéine situé(s) à proximité ou dans le site de liaison est (ou sont) responsable(s) des effets observés. De la même manière, en utilisant des réactifs chimiques spécifiques des résidus de lysine, d'arginine et de tyrosine (le PLP, le PG et le TNM (fig. 34) respectivement), nous avons voulu déterminer la participation éventuelle de ces résidus dans l'interaction RAR-ligand et cela pour les trois récepteurs α , β et γ en présence de deux ligands agonistes, le *t*-RA et le CD367. Cependant, comme le pourcentage de molécules de récepteurs fonctionnels surexprimés grâce au système bactérien est assez faible, nous avons, dans un premier temps, tenté de pallier cet inconvénient en réalisant des essais de dénaturation-renaturation. Malgré tous nos efforts, ces expériences se sont montrées infructueuses et nous avons donc décidé, pour la suite de notre étude, d'utiliser le récepteur exprimé à partir d'un extrait bactérien non purifié, tout en sachant que sur l'ensemble des molécules surexprimées, environ 10 % possèdent une activité fonctionnelle de liaison au ligand. Pour mesurer l'effet de la modification chimique sur l'affinité de liaison au ligand, le domaine E exprimé de chaque récepteur est soumis dans un premier temps à l'action du réactif, puis il est incubé avec le ligand marqué au tritium. L'activité de liaison au ligand est alors déterminée. Nous avons, en outre, vérifié par hydrolyse acide totale sur l'extrait brut

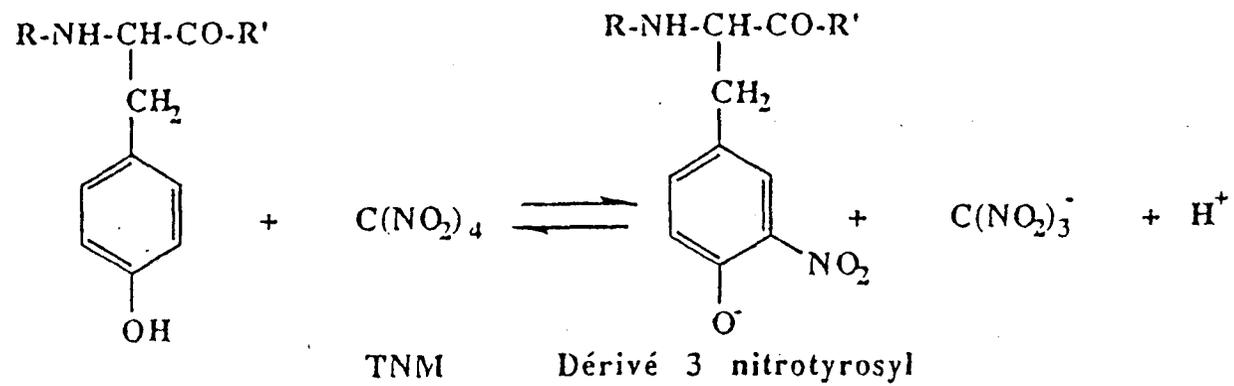


Fig. 34 : Nitration du résidu de tyrosine par le TNM

que nous étions en concentration saturante en réactif par rapport au nombre de résidus accessibles.

1.2. Résultats des expériences d'inactivation

Trois réactifs ont donc été utilisés : le PLP, le PG et le TNM. Pour chacun de ces réactifs, nous avons déterminé la concentration en réactif nécessaire pour obtenir 50% d'inactivation de la liaison spécifique au ligand du récepteur que nous avons appelée $I_{50\%}$. Avec le PLP et le PG, quel que soit le récepteur et le ligand, la valeur de $I_{50\%}$ est de l'ordre de 20mM et de 2,5mM respectivement (conférer D.E.A.). Ces données suggèrent donc une implication plausible des résidus de lysine et d'arginine dans l'interaction récepteur-ligand. Cependant, le TNM apparaît être le réactif le plus efficace pour inhiber la liaison. En effet, sur les trois récepteurs α , β et γ , nous avons obtenu une valeur de $I_{50\%}$ comprise entre 22,7 et 77,1 μ M avec le *t*-RA et le CD367 (tab. 6). De plus, nous avons constaté que le complexe préformé [3 H]*t*-RA-RAR était insensible à l'inactivation chimique par le TNM. Le ligand pourrait alors protéger les résidus d'acides aminés du site de liaison contre les modifications chimiques. Comme le domaine E de RAR α ne comprend que trois résidus de tyrosine, nous avons alors supposé qu'un de ces résidus ou plusieurs étai(en)t impliqué(s) dans la liaison du ligand.

2. Protection différentielle des RARs par les ligands

2.1. Principe de la protection différentielle

Comme il a été précisé dans le paragraphe précédent, la protection par *t*-RA et le CD367 contre l'inactivation par le TNM est excellente. Nous nous sommes donc demandé si des différences de protection ne pouvaient pas être observées en fonction des ligands utilisés. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de protection différentielle basées sur une réaction d'échange entre le ligand et le *t*-RA tritié. (Les seuls ligands tritiés à notre disposition sont le *t*-RA et le CD367). Le principe de cette technique est assez simple. Nous incubons le récepteur exprimé par le système bactérien *E. coli*, avec un ligand en concentration saturante (2 μ M). Ensuite, le récepteur est modifié par le TNM (gamme de concentrations). Puis une réaction d'échange est effectuée avec le *t*-RA tritié et l'affinité de liaison résiduelle est alors mesurée. De cette façon, nous avons observé si la modification chimique empêchait ou non la liaison de *t*-RA. Dans le cas d'une activité de liaison résiduelle

Réactif	RAR	Ligand	I _{50%} (μM)
TNM	α β γ	<i>t</i> -RA	30.3
			77.1
			22.7
	α β γ	CD367	35.7
			62.8
			23.6

Tab. 6 : Concentrations en TNM nécessaires pour obtenir 50% d'inactivation de la liaison spécifique du ligand au récepteur

faible, deux hypothèses sont alors possibles. Soit le ligand non marqué qui se trouve à l'intérieur du site de liaison est gêné pour sa sortie par les résidus chimiquement modifiés et empêche le *t*-RA radioactif de venir se fixer à sa place, soit la liaison de ce ligand entraîne un changement de conformation tel qu'à la suite des modifications chimiques, le *t*-RA ne peut plus venir se fixer à l'intérieur du site de liaison.

2.2. Protection observée selon les ligands et les réactifs

Les ligands testés sont les suivants : le 9*c*-RA, le CD367 pour les ligands agonistes des trois RARs, l'Am580 sélectif de RAR α , le CD417 sélectif de RAR β , le CD437 et le CD666 sélectifs de RAR γ et le ligand antagoniste de RAR α , le Ro41-5253. Dans le tableau 7, le pourcentage d'activité de liaison résiduelle de [³H]*t*-RA est déterminée pour une concentration en TNM de 50 μ M. Ainsi, nous avons constaté que la protection par les différents ligands contre l'inactivation chimique est totale dans la plupart des cas excepté avec l'Am580 pour RAR α et le 9*c*-RA pour RAR γ . Avec ces deux ligands, le pourcentage de liaison résiduelle est réduit d'environ 40% par rapport à *t*-RA. Il est donc possible que ces ligands se positionnent différemment dans le site de liaison. En prenant en compte le fait que le 9*c*-RA se lie moins bien à RAR γ qu'à RAR α et les données cristallographiques aujourd'hui disponibles (Renaud J.P et *al.*, 1995, Klaholz B.P. et *al.*, 1998), nous savons que 9*c*-RA se positionne différemment dans la cavité de liaison. En effet, l'orientation de son groupement méthyle sur C₁₃ est différente de celle de *t*-RA. Le fait de modifier les résidus de tyrosine accessibles aux réactifs chimiques entraîne probablement une conformation un peu différente de la poche de liaison et empêche le *t*-RA de venir se fixer à la place du 9*c*-RA.

3. Expériences de protéolyse limitée

La protéolyse limitée est une technique qui permet d'étudier des changements de conformation du récepteur induits par la fixation du ligand. Cette méthode a été largement employée par Keidel S et *al.* pour mettre en évidence des différences de conformation lors de l'activation de RAR α par des ligands agonistes et antagonistes (Keidel S. et *al.*, 1994). Ainsi par la même approche, nous avons réalisé des expériences de protéolyse limitée sur RAR α en présence de différents ligands (ce sont les mêmes ligands que ceux utilisés pour la protection différentielle). Le récepteur RAR α est exprimé dans un lysat de réticulocytes en présence de [³⁵S] méthionine. Il est ensuite incubé avec le ligand, puis hydrolysé par différentes enzymes.

Récepteur	Ligand	% de liaison résiduelle [³ H]t-RA avec TNM (50 μM)
RARα	Sans ligand	26
	<i>t</i> -RA	100
	<i>9c</i> -RA	97
	CD367	86
	Am580	66
	Ro41-5253	95
RARβ	Sans ligand	60
	<i>t</i> -RA	98
	<i>9c</i> -RA	84
	CD367	86
	CD417	78
RARγ	Sans ligand	11
	<i>t</i> -RA	93
	<i>9c</i> -RA	61
	CD367	91
	CD437	92
	CD666	88

Tab. 7 : Mesure de l'activité de liaison résiduelle de RAR α , β et γ protégés par différents ligands contre l'action du TNM.

Les échantillons sont ensuite déposés en gel SDS-Page. Nous avons, en premier lieu, utilisé la trypsine (fig. 35, premier gel). Dans le premier couloir du gel, nous retrouvons le récepteur non hydrolysé avec une masse d'environ 52kDa. Dans le couloir 2, nous constatons qu'en absence de ligand, la digestion du récepteur est complète et que seuls des polypeptides de petites tailles sont retrouvés. Les puits suivants correspondent au RAR α hydrolysé par la trypsine en présence des différents ligands. Sur chacun de ces profils, nous retrouvons un fragment de 30kDa excepté avec le Ro41-5253. Ainsi, avec ces différents ligands, la région de résistance à l'attaque protéolytique semble identique. Comme nous n'avons pas observé de différences de profils avec les ligands agonistes, nous avons hydrolysé le récepteur avec d'autres enzymes, la chymotrypsine et l'endoprotéase Glu-C. Cependant, bien que les sites de coupure soient différents, les profils d'hydrolyse avec les ligands agonistes restent identiques entre eux. Ainsi, seule la fixation de l'antagoniste Ro41-5253, permet d'obtenir un profil protéolytique différent. Nous observons alors, avec la trypsine, un fragment de 28kDa en présence de Ro41-5253 (résultats identiques à ceux obtenus par de Keidel S. et *al.*, 1994). Comme la trypsine hydrolyse en C-terminal des résidus d'arginine et de lysine, nous avons utilisé l'endoprotéase Lys-C et l'endoprotéase Arg-C pour affiner les résultats. Avec l'endoprotéase Lys-C, le profil reste identique à celui obtenu avec *t*-RA, par contre avec l'endoprotéase Arg-C, le profil est différent avec un fragment supplémentaire aux environs de 31kDa en présence de Ro41-5253 (fig. 35, gels 2 et 3). Ceci suggère que le Ro41-5253 se positionne différemment dans le site de liaison rendant un ou des résidu(s) d'arginine plus accessible à l'hydrolyse. Lamour F.P.Y. et *al.*, ont permis de confirmer cette hypothèse en identifiant l'arginine 217 de RAR α qui se trouve dans la boucle Ω , comme le site de clivage de la trypsine en présence du Ro41-5253 (Lamour F.P.Y. et *al.*, 1996). Néanmoins, dans le cadre de notre étude, cette technique apporte peu de précisions sur les acides aminés impliqués ou sur d'éventuels changements de conformation de RAR α induits par la fixation de ligands agonistes.

4. Etude des résidus de tyrosine du domaine de liaison au ligand de RAR α

Par les expériences d'inactivation par le TNM, nous avons montré que RAR α était très sensible à ce réactif ce qui suggérait une implication probable des résidus de tyrosine dans l'interaction récepteur-ligand. Le domaine E de RAR α ne comprend que trois résidus de tyrosine : la tyrosine 208, la tyrosine 277 et la tyrosine 362. Nous avons donc voulu identifier quel(s) étai(en)t le(s) résidu(s) potentiellement impliqué(s).

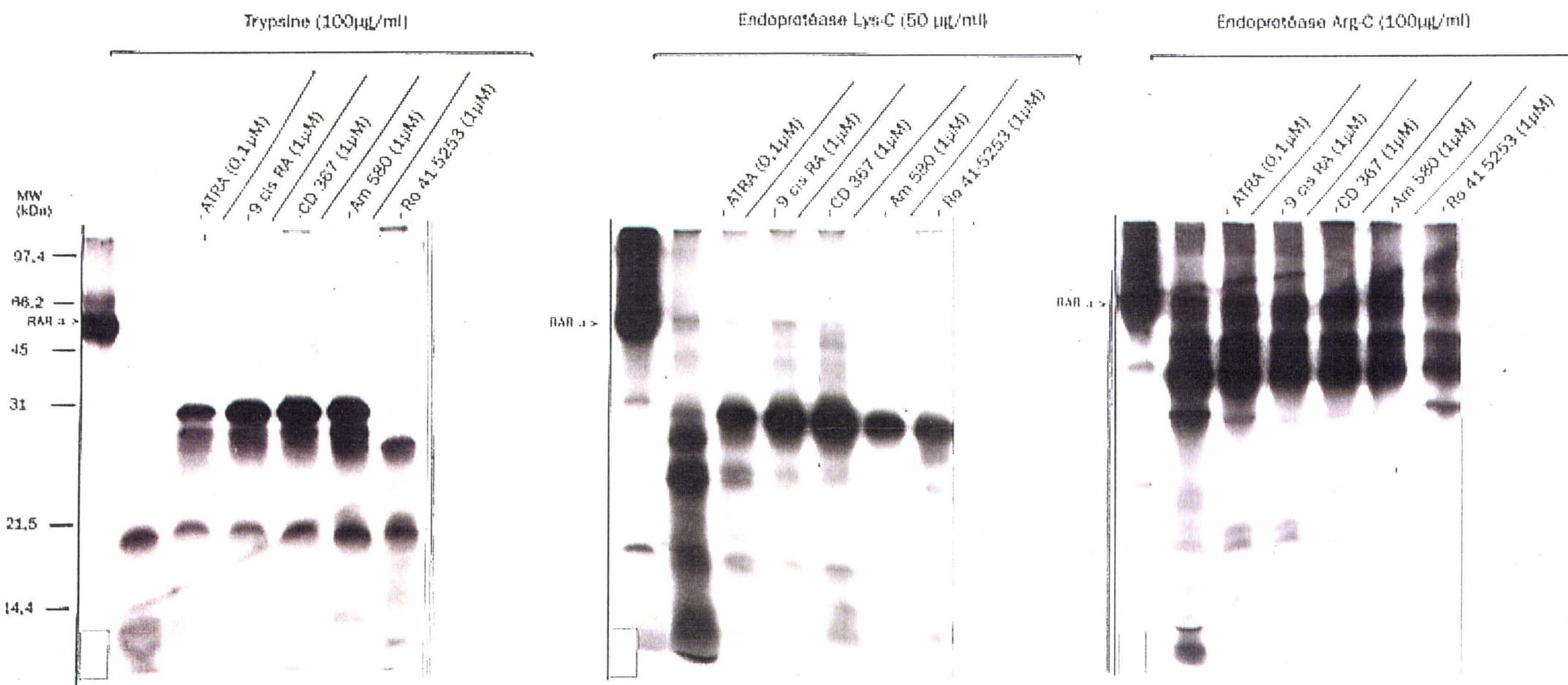


Fig. 35 : Protéolyses limitées de RARα en présence de différents ligands agonistes et d'un antagoniste par la trypsine, l'endoprotéase Lys-C et l'endoprotéase Arg-C

4.1. Résumé de nos travaux soumis à publication

Les récepteurs de l'acide rétinoïque lient spécifiquement l'acide *tout-trans* rétinoïque et agissent en tant que facteurs de régulation de la transcription. La liaison de *t*-RA à RAR α , β et γ est sensible à la nitration par le tétranitrométhane, un réactif modifiant plus spécifiquement les tyrosines dans des conditions réactionnelles définies. Pour identifier le(s) résidu(s) de tyrosine importants pour la liaison de *t*-RA, nous avons réalisé des expériences de modification chimique sur le domaine de liaison de RAR α (LBD- RAR α) purifié, soumis à une hydrolyse acide partielle et une protéolyse sélective. Les peptides chimiquement modifiés, contenant chacun un des trois résidus de tyrosine présents dans la séquence du LBD-RAR α , ont été analysés et identifiés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en mode électrospray (LC/ESI-MS). Nous avons trouvé que le *t*-RA lié au LBD-RAR α protégeait la tyrosine 277 de la nitration mais pas les tyrosines 208 et 362. La protection de la tyrosine 277 peut résulter soit d'un masquage direct par la liaison du ligand, soit d'un changement de conformation induit par la fixation du ligand rendant la tyrosine inaccessible à la modification chimique. Le rôle éventuel des résidus de tyrosine a été appréhendé par la construction de trois mutants spécifiques : Y208A, Y277A et Y362A. L'affinité de liaison pour le *t*-RA de ces récepteurs mutants est de l'ordre de celle du récepteur sauvage, excepté pour le mutant Y277A qui présente une réduction d'affinité de liaison et d'activité de transactivation de 15 à 20 fois. Si la mutation de la tyrosine 277 en alanine a un effet variable sur la liaison de différents agonistes et antagonistes, elle entraîne une forte réduction de l'activité de transactivation ligand-dépendante. Il est peu probable qu'un changement de conformation important soit responsable de la réduction d'affinité de liaison de *t*-RA et de l'activité transactivatrice puisque ces mutants se dimérisent et se lient à l'ADN d'une façon identique au récepteur sauvage. La protéolyse limitée révèle que le mutant Y277A induit un changement de conformation légèrement différent de celui du récepteur sauvage. Ces données suggèrent que la tyrosine 277 joue un rôle dans le changement de conformation nécessaire à l'activation de RAR α .

4.2. Publication

CRITICAL ROLE OF TYROSINE 277 IN THE LIGAND-BINDING AND TRANSACTIVATING PROPERTIES OF RETINOIC ACID RECEPTOR α .

Sandrine Mailfait^{1*}, Denise Belaiche¹, Mostafa Kouach¹, Nathalie Dallery¹, Philippe Chavatte², Pierre Formstecher¹, and Bernard Sablonnière^{1§}.

¹U459 INSERM, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine Henri Warembourg
1, place de Verdun, 59045 LILLE Cedex, France

²Institut de Chimie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie
3, rue du Professeur Laguesse, 59006 LILLE, France

[§]: Corresponding author.

Tel +33 3 20 62 68 76

Fax +33 3 20 62 68 84

email: sablonniere@lille.inserm.fr

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre d'Etudes et de Recherches Dermatologiques Galderma, Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Université de Lille II. INSERM U459 is part of IFR 22 (INSERM, Université de Lille II, Centre Hospitalier et Universitaire and Centre Oscar Lambret).

* Supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Running title: Role of tyrosine residues in RAR α ligand-binding domain

Summary

Retinoic acid receptors specifically bind all-*trans* retinoic acid (t-RA) and function as t-RA-inducible transcriptional regulatory factors. Binding of t-RA to RAR α , β and γ is sensitive to nitration with tetranitromethane, a tyrosine-specific modifying reagent. In order to identify tyrosine residue(s) that are important for t-RA binding, we carried out chemical modification experiments with purified RAR α ligand binding domain (RAR α -LBD) subjected to partial acid hydrolysis and selective proteolysis. The chemically modified peptides containing each of the three Tyr residues present in the RAR α -LBD sequence were then analyzed and identified by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS). We found that t-RA binding to RAR α -LBD protected Tyr²⁷⁷ containing peptides from nitration. Protection of Tyr²⁷⁷ could result either from direct masking by the bound ligand or from ligand-induced changes in receptor conformation and tyrosine accessibility. The role of Tyr residues was further documented by site directed mutagenesis using three site-specific RAR α mutants: Y208A, Y277A, and Y362A. The affinity for t-RA of these mutant receptors was in the range of that of the wild type protein, except for the Y277A receptor mutant which displays a 15 to 20-fold reduction in affinity and transactivation activity for t-RA. Whereas mutation of Tyr²⁷⁷ into alanine had a variable effect on different agonists and antagonists binding, it caused a dramatic decrease of retinoid-dependent transactivation activity. It is unlikely that major conformational changes are responsible for the lower affinity of t-RA binding and t-RA-dependent transactivation since these mutants displayed wild type dimerization and DNA binding activities. Limited proteolysis revealed that upon ligand-binding, the Y277A mutant induced a conformational change slightly different from that obtained with the wild type protein. These data could suggest that Tyr²⁷⁷ play a critical role in the ligand-induced conformational changes required for the activation of RAR α .

Introduction

Retinoic acid (t-RA) and synthetic retinoids have important effects on a wide spectrum of biological processes, including cell growth, cell differentiation and vertebrate development (1). These effects are mediated by two distinct families of receptors, the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs), which belong to the steroid/thyroid hormone superfamily of nuclear receptors (2). These two families of receptors are each made up of three receptor subtypes, designated α , β and γ (3-11). These receptors are ligand-inducible transcription factors able to bind, as hetero (RAR-RXR) or homo (RXR-RXR) dimers, to specific retinoic acid response elements (RAREs) located in the promoter region of target genes. Two different isomers, all-*trans* RA (t-RA) and 9-*cis* RA, are the natural ligands for the RARs, whereas only 9-*cis* RA is the natural ligand for the RXRs (12,13). The RARs and RXRs exhibit a conserved modular structure, divided in six different domains (A-F), according to their homology with the other nuclear receptors (14). Unique functions have been devoted to some of these domains. The ligand-independent transactivation function (AF-1) is located in the A and B domains, whereas the C domain constitutes the highly conserved DNA-binding domain also required for receptor dimerization (15). The E domain is functionally complex and has been identified as important for ligand binding, receptor dimerization and ligand dependent activation of transcription (AF-2).

Recently, the X-ray crystal structures of the ligand binding domains of apo-RXR α and of holo-RAR γ complexed to t-RA, 9-*cis* RA and to a RAR γ selective synthetic agonist have been reported (16-18). According to the structural and functional similarities between the ligand binding domains of the different RAR subtypes, a common folding pattern has been proposed (19), and putative aminoacid residues responsible for the selectivity of some synthetic retinoids have been identified (17,19). The role of several aminoacid residues of the LBD in the binding of t-RA, 9-*cis* RA and synthetic retinoids to the RAR subtypes has been also highlighted by site-directed mutagenesis (17,20-29). Our group contributed to the identification of some structural requirements of the ligand binding site of the human RAR α . We demonstrated the role of the AF-2 domain in the differential recognition of natural and synthetic retinoids (30). The

importance of residues 403 to 410 in the binding and transactivating properties of the receptor was further documented by site-directed mutagenesis (31,32). Moreover we resorted also to the chemical modification of protein side-chains with group-specific reagents to demonstrate that cysteine residues are essential for ligand binding (33) and that lysines 360 and 365 are critical for the DNA binding and dimerization properties of RAR α (34).

In the current report, we show that t-RA binding to RAR α , β and γ is inhibited by previous treatment of the receptor with tetranitromethane, a tyrosine-specific modifying reagent, suggesting that tyrosine residue(s) could be located in the ligand binding pocket (LBP) of these receptors. In order to identify the tyrosine residue(s) important for t-RA binding, we resorted both to the chemical characterization of the modified polypeptide by Electron Spray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) and to the site-directed mutagenesis of each of the three tyrosine residues present in the hRAR α -LBD sequence. Taken together, our data demonstrate that Tyr²⁰⁸ and Tyr³⁶² play no direct role in the ligand receptor interaction, whereas Tyr²⁷⁷ is a specific determinant of the ligand binding and transactivating properties of the receptor. Mutation of Tyr²⁷⁷ into alanine resulted in altered binding affinity and specificity for t-RA and various synthetic retinoids, with a dramatic decrease in ligand-dependent gene transactivation.

Materials and Methods.

Materials.

Synthetic retinoids and ^3H CD367 (52.5 Ci/mmol, (35)) were provided by U. Reichert (CIRD-Galderma, Valbonne, France). The RAR α specific antagonist was obtained from Hoffman-La Roche Inc., Basel, Switzerland. [^3H]t-RA (55.6 Ci/mmol; 1mCi/ml) was obtained from DuPont/NEN, France and all-*trans*-RA was purchased from Sigma (St Louis, MO). Restriction enzymes were from Promega (Madison, WI); Isopropylthio- β -galactopyranoside (IPTG), ampicillin and kanamycin were from Appligene (Strasbourg, France). Oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Le Sart-Tilman, Belgium). The PCR-site directed mutagenesis kit was from Stratagene (La Jolla, CA). Trypsin, chymotrypsin and endoproteinase Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8 protease) were from Boehringer (Mannheim, Germany) and all other chemicals were from Merck (Darmstadt, Germany).

Tyrosine modification procedures in crude bacterial extracts.

Wild-type RAR α , β and γ inserted into bacterial expression vector pET3a, generous gifts from Prof. P.Chambon (IGBMC, Illkirch, France) were expressed in *E.coli* BL21(DE3). Transformed bacteria were grown overnight in LB broth supplemented with 200 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 30 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol. These precultures were grown in 1L of LB broth to an OD₅₈₀ of 0.8 and then 0.5 mM IPTG was added. Derepression proceeded for 3h after which time cells were pelleted and resuspended in a buffer containing: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 10% saccharose, 1 mM PMSF, 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and 20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin. To obtain the bacterial lysate, lysozyme was added to a final concentration of 0.5 mg/ml, and the cell suspension was incubated on ice for 30 min. Triton was added to a final concentration of 0.1% and the extract was sonicated on ice three times for 20 sec. Then, the lysate was brought to 0.4 M NaCl. The homogenate was centrifuged for 15 min at 20,000 x g. The supernatant was precipitated using PEI (0.2% final concentration) to remove most of the DNA. The bacterial extracts was then adjusted to 10% glycerol. To determine the ligand binding susceptibility of the receptor to tetranitromethane (TNM), aliquots of crude bacterial extracts were diluted to 1:20 in 20 mM Tris-HCl pH 9.00 and treated with TNM (0.2-200 μM) for 2h at 0°C. The chemical

reaction was stopped by the addition of stoichiometric concentrations of DTT and samples were assayed for retinoid-binding activity with tritiated RA, as described below. In case of protection experiments, bacterial extracts were preincubated with 1 μ M labeled t-RA for 16h at 0°C prior TNM treatment.

Expression, chemical modification and purification of His₆-hRAR α Δ N186-462.

The RAR α cDNA was introduced into the pQE-9 vector as described previously (30). Transformed M15 bacteria were grown and protected from light in LB broth supplemented with 100 μ g/mL ampicillin and 25 μ g/mL kanamycin with or without 10⁻⁶ M t-RA. Following 5h after IPTG induction, cells from 500 mL cultures were pelleted and resuspended in 1 mL of cold 20 mM Tris-HCl, pH 8.00, 1 mM PMSF, 20 μ g/mL leupeptin and 20 μ g/mL aprotinin. The samples were then sonicated on ice three times for 1 min. Samples were then incubated or not with 10⁻⁶ M t-RA before the nitration step. For nitration, 10 μ l of 500 mM TNM (in ethanol) was added and then samples were incubated for 5h on ice. Nitration was stopped by the addition of 10 μ l 500 mM DTT. 5 ml of denaturing buffer (6 M GuCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 20 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 8.00) was then added and samples were incubated for 1h. After centrifugation for 45 min at 20,000 x g, the supernatant was recovered. The recombinant receptor was then purified by affinity chromatography using the NiTA-resin system (Diagen, Düsseldorf, Germany) as recommended by the manufacturer. The protein concentration in the final eluate was determined by the Bio-Rad protein assay and 20 μ g of total protein was loaded on a sodium dodecyl sulfate (SDS)- 10 % polyacrylamide gel to control the expression of His₆-hRAR α Δ N186-462 in both the crude protein extract and in the eluate. The presence of the receptor was detected on western blot using a polyclonal anti-RAR α antibody as previously described (33).

Receptor proteolysis, liquid chromatography and ESI-MS.

In each experiment, 100 nmoles of purified His₆-RAR α Δ N186-462 (10 nmoles/ml) were dialysed for 7 days against HCl 0.01 N and lyophilized before hydrolysis by 0.25 N acetic acid at 105°C for 24h. Following lyophilization, the hydrolysate was further dissolved in 0.5 ml of 50 mM ammonium acetate pH 4.00, submitted to *Staphylococcus aureus* V8 protease hydrolysis using an enzyme to receptor ratio of 1/50 for 16h at 37°C and then dried under

vacuum. Receptor fragments (12 nmoles) were separated by HPLC on a microbore reversed-phase column from Brownlee-Applied Biosystems (C-4, 5 μ m particles, 2.1 mm i.d, 100 mm long), at a flow rate of 200 μ L/min. The binary solvent system used in the analysis of peptide fragments was: solvent A: H₂O, 0.01 vol % CF₃COOH, and solvent B: CH₃CN, 0.01 vol % CF₃COOH. Peptides were eluted by a linear gradient of 10 to 100% solvent B in 60 min. An API-1 (simple quadrupole) mass spectrometer system (Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Canada) was used for the analysis of the receptor fragments. Data acquisition and processing of the molecular mass of receptor peptides were controlled by the MAC Biospec data system. This program was used to select peptide fragments from the known sequence of the receptor and match them with the masses observed for the receptor fragments. The ion spray voltage was operated at 5.5 kV and the spectra were recorded at an orifice voltage of + 90 V. Collection of all electrospray data was performed on samples coupled through an HPLC/ESI MS interface with an Applied BioSystems microbore HPLC(see above). A calculated split ratio of 1:5 was established such that 40 μ L/min HPLC eluent was directed to the ESI-MS probe for nebulization. A polypropyleneglycol solution :PPG 425, 1000 and 2000 in 50/50/0.1 H₂O/methanol/formic acid (v/v/v) was used for external calibration of the ESI/MS from *m/z* 400-2400 in the positive mode. Typical ESI data acquisition was performed using 5.5 sec scans; the resulting total ion chromatograms (TIC) cover *m/z* 400-2400 with a step size of 0.1 Da and a dwell time of 0.5 ms.

Plasmid Constructs and Site-directed Mutagenesis.

Points mutations were introduced in the RAR α cDNA using the ExSite PCR-based site-directed mutagenesis kit and all reactions were carried out as suggested by the manufacturer (Stratagene). The hRAR α full-length cDNA was cloned into the *Bam* HI and *Hind* III restriction sites of pQE-9 as described (30) and used as template for the preparation of the mutants. The GCC codon was used to encode the mutant Ala residue indicated in bold in the mutagenic primers. For the preparation of Y208A, a specific PCR fragment was prepared using the primer pairs Y208A 5'-s (5'CTCTGCCAGCTAGGCAAAG**CC**ACTACGAACAACAG 3') and Y208A 3'-as (5'GGCAGGGAAGGTTTCCTGGTGC**GC**TTTGCAC 3') respectively. For the Y277A mutant, the following primers were used: Y277A 5'-s:(5'CTGGATATCCTGATCCTGC**GC**GATC

TGCACGCGGGCCA 3') and Y277A 3'-as : (5' GCAGGCAGCCTTGAGGAGGGTGATCT GGTCGG 3'). Likewise, the Y362A mutant was constructed using the following primers: Y362A 5'-s: (5' CCGCTGCTCGAGGCGCTAAAGGTCGCCGTGCG 3') and Y362A 3'-as: (5' CTCCTGCAGCATGTCCACCCGGTCCGGCTGCTCC 3'). The *Sac* I-*Bcl* I fragment that contained the desired mutation was exchanged with that of pSG5-hRAR α wild type to create each of the mutant DNA constructs. In all cases, the presence of the specific mutation and the lack of random mutations were verified by DNA sequence analysis.

Retinoid Binding Assays.

The receptor extracts were diluted in binding buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.00, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol) to a final concentration of 100 μ g of total protein. Total t-RA binding was determined in the diluted extracts by adding tritiated t-RA in the concentration range of 2.5 to 20 nM and incubating for 16h at 4°C. Dilutions of t-RA were made in ethanol. Nonspecific binding was determined in the presence of 100-fold molar excess unlabeled t-RA. Bound t-RA was separated from free by charcoal-dextran adsorption as described (36). Specific t-RA binding was determined by subtracting the nonspecific binding from the total binding. Apparent equilibrium dissociation constants (K_d) were determined for the wild type and each mutant protein by Scatchard analysis. K_d values of retinoids for RAR α and Y277A RAR α mutant were determined by competition experiments as described (30).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA):

The wild type RAR α , RXR α and mutant receptors were all *in vitro* translated proteins prepared from rabbit reticulocyte lysates as described (34). Briefly 20 μ g of lysate protein (10 μ g of wild type or mutant RAR α lysate protein and 10 μ g of RXR α lysate protein) were preincubated with 1 μ M t-RA or CD367 in 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 5% glycerol for 20 min at 4°C. The DNA binding reactions were then set up in 20 μ l with 1 μ g of salmon sperm DNA, 0.04 pmole ³²P-labeled β RARE probe, and, if indicated a 50-fold molar excess of unlabeled probe for 15 min at 4°C as described previously (34). When required, 2 μ l of monoclonal antibodies directed against hRAR α or against hRXR α (RAR α C-20 and RXR α D-20 monoclonal antibodies, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa

Cruz, CA) were added for a further 2 hours incubation at 4°C. Protein-DNA complexes were then resolved on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel containing 1 % glycerol in 1x TBE run at 150V for 3h at 4°C . The gel was dried and exposed to Amersham hyperfilm MP at -70°C overnight.

Transactivation assay.

COS-7 cells (5.0×10^5 cells/60 mm dish) were transiently transfected via PEI precipitation (37) with 0.3 µg of the reporter plasmid pTRE-pal Luc, 0.1 µg of the β-galactosidase expression plasmid (pCHI10, Pharmacia); 0.03 µg of wild-type pSG5-RARα or mutant-pSG5-RARα plasmids and 0.03 µg of pSG5-hRXRα. 24 h after introduction of the DNA precipitants, cells were fed with Dulbecco's Modified Eagle's medium containing 2.5% fetal bovine serum. Transfected cells were incubated for an additional 24 h with various concentrations of ligands (10^{-10} to 10^{-5} M). After rinsing with phosphate-buffered saline, cells were lysed and luciferase activity was measured as described previously (38). Luciferase values represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations normalized to β-galactosidase activity.

In vitro transcription, translation and limited proteolytic digestion.

Wild type RARα and mutants in pSG5 were transcribed and *in vitro* translated in the presence of [35 S]methionine by using rabbit reticulocyte lysates as specified by Promega. Aliquots of reticulocyte lysates containing the labeled receptors were incubated with t-RA at 10^{-6} M or CD367 at 10^{-6} M for 20 min at room temperature. Then, different aliquots were treated with trypsin at final concentrations of 50µg/ml and 300µg/ml; or chymotrypsin at a final concentration of 50µg/ml. After 10 min at 20°C (trypsin) or 30 min at 37°C (chymotrypsin), the digestion was stopped by adding 5µl of sodium dodecylsulfate (SDS) sample buffer and boiling for 3 min. SDS/Polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography were carried out as described previously (39).

Results

Effects of tyrosine modification of RAR α , RAR β , and RAR γ on t-RA binding.

Fig. 1 shows the concentration dependent effects of TNM on retinoid binding. Full-length RAR α , β and γ exhibit a dramatic reduction in t-RA binding upon treatment with TNM, giving IC_{50%} values of 18 μ M, 53 μ M and 25 μ M for RAR α , β and γ respectively. This loss of t-RA binding was not observed when crude bacterial extracts were incubated with t-RA prior to TNM treatment. This protection effect strongly suggests that one (or several) essential Tyr residue(s) lie in the retinoid binding site. As depicted in Fig. 2, only three Tyr residues are located inside the RAR α -LBD: Tyr²⁰⁸ between H1 and H3, Tyr²⁷⁷ at the end of H5 and Tyr³⁶² in helix H9. Interestingly all these tyrosines are conserved in RAR α , β and γ and none of them belongs to the ligand binding pocket defined in the crystal structure of the RAR γ -LBD bound to t-RA (17). However Tyr²⁷⁷ is contiguous to Arg²⁷⁶ (Arg²⁷⁸ in RAR γ), a very important residue of RAR γ -LBP.

Analysis of the TNM-modified RAR α -LBD by HPLC/ESI-MS and selective protection by the ligand.

In order to address the role that the three Tyr residues play in the ligand binding domain, we had to answer two questions: how many of these tyrosines were modified (and therefore accessible) in the native LBD and which one(s) were protected from chemical modification by the previous binding of the ligand. Therefore and in order to avoid the interference of the Tyr residues present in the other domains of the receptor, recombinant His₆-hRAR α Δ N186-462 was produced in bacteria and used as starting material for chemical modification with TNM. It was already demonstrated in our laboratory that this deletion mutant, which encompasses most of the LBD depicted in Figure 2, with the exception of the first six aminoacids of helix 1, displayed binding properties comparable to that of the wild type receptor (30). Crude receptor extracts, incubated or not with t-RA were submitted to TNM modification. After purification by affinity chromatography on the NiTA resin system (30), receptors were subjected to a partial acid hydrolysis (resulting in cleavages at the N- and C-termini of Asp residues, and of some deamidated forms of Asn and Gln residues) and to a selective proteolysis

with endoproteinase Glu-C (resulting in a selective cleavage at the C-terminus of Glu residues). A control sample corresponding to the native receptor not incubated with TNM was also analyzed. Each sample was analyzed by HPLC/ESI-MS and the chemically modified peptides were identified (Table I). In the absence of preincubation with t-RA, the three receptor fragments containing each one of the three Tyr residues had an observed mass higher than the mass predicted for the unmodified peptide. The difference (Δ mass) between the observed and the predicted mass was close to 45 Da for all peptides, in agreement with the selective nitration of one tyrosine residue (44.98 Da). Thus in the native LBD, all tyrosine containing peptides were modified by treatment with TNM. On the contrary, following preincubation with t-RA, only Tyr²⁰⁸ and Tyr³⁶² peptides were modified as before, whereas Tyr²⁷⁷ peptide was protected as judged by the absence of difference between the observed and predicted masses. Therefore, only one Tyr residue, Tyr²⁷⁷ displayed the expected chemical characteristics of a residue lying in the LBP, and its modification is probably responsible for the observed inhibition of t-RA binding after TNM treatment.

Effect of tyrosine point mutations in the E domain of RAR α on t-RA binding and t-RA-dependent transactivation.

Three site-specific mutants of RAR α in which Tyr²⁰⁸, Tyr²⁷⁷ and Tyr³⁶² were individually replaced with an Ala residue (Y208A, Y277A and Y362A) have been prepared. Western blot analysis of receptor extracts containing wild type and mutant RAR α proteins detected a major band that migrated at the same position (approximate molecular mass of 53 kDa). In addition, the wild type and mutant receptors displayed a similar level of expression (data not shown). As it can be seen in Table II, the t-RA K_d values for wild type and both Y208A and Y362A mutants were similar. Interestingly the Y277A mutant displayed a K_d value of 53 nM which is 15-fold higher than that of wild type RAR α . This difference in K_d is reflected by the similar 21-fold decrease observed in the transactivation assays. The Y208A mutant displayed only a small reduction in activity in the transactivation assay whereas the EC_{50} value for Y362A was 12-fold higher than that of the wild type receptor.

Effect of tyrosine point mutations on DNA binding and dimerization.

The ability of the wild type and the RAR α mutants to bind a RARE and dimerize *in*

in vitro was then examined using the EMSA (Fig. 3). The three RAR mutants produced a gel shift pattern similar to that of the wild type RAR α . In all cases, the retarded receptor-DNA complexes were upshifted by both the RAR and RXR-specific antibodies. This demonstrates that the different EC₅₀ values in the transactivation assays and the apparent discrepancy between the ligand binding and transactivating properties of the mutant Y362A were not due to an inability of the mutants to bind the DNA sequence of the RARE or to form heterodimers *in vitro*. The presence of the ligand (t-RA or CD367) did not interfere with these processes in these experimental conditions.

Mutation of Tyr²⁷⁷ results in the alteration of the retinoid binding specificity of RAR α

Among the three mutants studied, only one, Y277A, displayed a decrease in t-RA binding affinity (Table II). The binding properties of this peculiar receptor mutant were further explored. As a significant reduction in t-RA binding was observed for mutant Y277A, this mutant was tested for its ability to bind the RAR α agonist CD367. Using direct [³H]CD367 binding assay, we observed a K_d value of 2.5 nM which is similar to that obtained with the wild type receptor (data not shown). Therefore, the K_i values of several natural and synthetic retinoids were determined using competition experiments with tritiated CD367 (Table III). The retinoids tested included 9 *cis*-RA, a natural agonist ligand for RARs, retinol, the metabolic precursor of t-RA that is unable to bind and transactivate RARs, three synthetic RAR α agonists (CD367, Ch55, Am580) and three RAR α antagonists (CD3105 or AGN193109, CD3106 or AGN192870, and Ro 41-5253). The RAR α binding and transactivating properties of these compounds have been already reported in the case of the wild type receptor (23,30,42 and references therein).

The effect of the mutation of Tyr²⁷⁷ into alanine on the ligand binding affinity appeared variable according to the structure of the ligand tested. Whereas the affinity for t-RA decreased 15-fold, no change was observed for 9 *cis*-RA. The affinity of the synthetic agonists tested was either unchanged (Ch55), or increased (CD367); or even decreased (Am580). Interestingly and contrary to Ch55 and CD367, Am580 is a RAR α selective ligand supposed to interact in a very specific way with some structural determinants of this receptor (26). The affinity of the antagonists belonging to the CD3105 (AGN 193109) series was either unchanged (CD3106) or slightly increased (CD3105), whereas a more significant increase in affinity was

observed in the case of Ro 41-5253. Finally the Y277A mutant acquired some affinity for retinol. None of the ligands tested, with the exception of all-*trans* and 9 *cis*-RA which were weakly active, appeared able to induce ligand-dependent transactivation with the Y277A mutant. This result suggest that Tyr²⁷⁷, besides its limited and variable role in ligand binding, is probably more involved in the ligand-induced conformational changes of the receptor leading to the transcriptionnally active form.

Impaired ligand-dependent protection of Y277A receptor mutant against proteolytic digestion.

Limited proteolysis allows the detection of the conformational changes induced in wild type RAR α by ligand binding (39). We used this technique to investigate the possible effects of the Y277A mutation on this process. As shown on Figure 4, in the absence of ligand, both wild type receptor and Y277A mutant were almost completely digested to peptides smaller than 14 kDa by trypsin (panel A, lanes 2 and 8) or chymotrypsin (panel B, lanes 2 and 6). Preincubation of wild type RAR α with t-RA or CD367 resulted in a clearly reduced proteolysis with the appearance of both trypsin (panel A, lanes 3-6) and chymotrypsin (panel B, lanes 3 and 4) resistant peptides. A main 30 kDa and a weaker 26kDa protected bands were obtained with trypsin, whereas 28 kDa and 26 kDa bands were obtained with chymotrypsin. The digestion pattern of the liganded Y277A mutant was characterized by the appearance of the same trypsin-resistant bands as those observed with the wild type receptor (panel A, lanes 9-12). However, the 30 kDa band seemed to resist slightly less efficiently at high trypsin concentrations (panel A, lanes 11 and 12). Interestingly, the chymotrypsin digestion pattern revealed a clear difference between the Y277A mutant and the wild type receptor: t-RA binding did not afforded any protection against proteolysis (panel B, lane 7), whereas a significant protection was observed with CD367, generating a 28 kDa band (panel B, lane 8). This difference in resistance to proteolysis could be explained by the differences in the binding affinities of these two ligands to the Y277A mutant. Incubation of the wild type and mutant receptors were performed with t-RA or CD367 at 1 μ M. Indeed, this concentration is high enough to obtain a saturation of the receptor-LBD even with t-RA in case of the Y277A receptor mutant. These results suggests that slightly different ligand-induced conformational changes occurred in the Y277A mutant when compared to the wild type receptor.

Discussion

This work documents the functional importance of the tyrosine residues present in the ligand binding domain of the RARs. We first used a chemical approach to show, by using TNM, an aminoacid side-chain specific reagent, that tyrosine(s) were probably involved in ligand binding. Enzymatic and partial acid hydrolysis of the chemically modified hRAR α LBD generated peptides that were analyzed by mass spectrometry. We demonstrated that the various peptides containing tyrosine, corresponding each to one to the three tyrosines of the RAR α LBD, were all modified by TNM in the native LBD, whereas the peptide containing Tyr²⁷⁷ was the only one protected by preincubation of the receptor with the ligand. TNM is the most frequently used chemical reagent for the modification of tyrosyl residues in native proteins (43). However it is not completely specific and several side-reactions have been reported in some proteins. Our results strongly suggest, but did not definitely prove that Tyr²⁷⁷ was essential for the ligand binding activity of RARs.

Therefore, the functional importance of this specific residue was further documented by site-directed mutagenesis. This approach combining chemical modification of specific aminoacid residues and mutagenesis, has already been used by Wolfgang et al. (24), who further extended our previous observation that t-RA binding to the three RAR types was blocked by sulfhydryl-modifying agents (33). By using site-directed mutagenesis, Wolfgang et al. (24) identified two cysteine residues responsible for the loss of t-RA binding presented by RAR β after chemical modification with sulfhydryl-specific reagents. One of these residues, Cys²²⁸ (Cys²³⁵ in RAR α) is located in helix 3 and belongs to the LBP of the crystallized holo-RAR γ (Fig. 2), whereas the other one, Cys²⁶⁷ (Cys²⁷⁴ in RAR α) is located in helix 5 and like Tyr²⁷⁷ does not belong to the LBP, but lies next to Ile²⁷³ which belongs to the LBP (Fig. 2). Interestingly, mutation of these cysteines into alanine did not alter the affinity of RAR β for t-RA, whereas chemical modification did, suggesting a steric hindrance mechanism rather than a direct role of these residues in t-RA binding. It is probably also the case for Tyr²⁷⁷ in RAR α for two reasons. Firstly, the decrease in affinity for t-RA observed in the Y277A mutant is lower than expected when compared to the drastic effect obtained after chemical modification of RAR α by TNM.

Secondly, in the t-RA-RAR γ crystal structure, Tyr²⁷⁹ (Tyr²⁷⁷ in RAR α) despite being next to Arg²⁷⁸ (Arg²⁷⁶ in RAR α), an essential residue that play a major role in ligand binding by interacting with the carboxyl group of t-RA, does not interact with t-RA and appeared turned towards the opposite direction (Fig. 5). Interestingly the side chain of Tyr²⁷⁹ is buried inside the LBD of RAR γ and inaccessible to the solvent (the only part of Tyr²⁷⁹ that appeared accessible to the solvent is its backbone, Fig. 5). Our hypothesis is that, in the apo RAR α , Tyr²⁷⁷ is accessible to the solvent and can be modified by TNM yielding a receptor structure that can neither bind properly its ligand nor undergo the conformational change concomittant to binding. Conversely, in the liganded receptor, Tyr²⁷⁷ becomes inaccessible to chemical modification because it is buried in a pocket delimited by H5 and H7 like in RAR γ . Interestingly, virtual nitration of Tyr²⁷⁹ in the crystal structure of the holoRAR γ resulted in steric hindrance (overlap of the Van der Waals volumes of the nitro group and of the side chains of Leu³¹⁹ in H7, data not shown) demonstrating that the conformation of the chemically modified receptor must be different from that of the wild type. Moreover, in the t-RA-RAR γ complex, both Tyr²¹⁰ and Tyr³⁶⁴ (corresponding to Tyr²⁰⁸ and Tyr³⁶² respectively in RAR α) appear accessible to the solvent (Fig. 5). The phenolic group of Tyr²¹⁰ lies on the surface of the receptor and is the most exposed to chemical attack, whereas Tyr³⁶⁴, despite being half-buried in the LBD core, is yet partly exposed to the solvent and therefore to chemical nitration by TNM. These structural characteristics are in perfect agreement with our experimental data. Tyr²⁰⁸, easily accessible in RAR α and displaying no obvious role in the receptor structure, can be chemically modified or mutated without any consequence on the binding and transactivating activities of the receptor. Tyr³⁶² is also accessible and not involved in ligand binding, however its chemical modification or mutation probably results in a conformational change affecting the LBD core structure with possible consequences on the ability of the liganded receptor to interact with corepressors and/or coactivators, explaining the decrease in transcriptional activity.

The Y277A mutant displayed an altered pattern of retinoid binding. The effect of the mutation on the affinity was variable and depended on the structure of the retinoid tested. From our binding experiments, Tyr²⁷⁷ does not appear to be essential for t-RA binding but may be important in the adoption of the final active conformation of the protein, since the Y277A

mutant displayed a significant reduction in t-RA dependent transactivation activity. One possible explanation is that this mutation has caused a small local change in the conformation of the receptor LBP sufficient to result in this modest decrease in the affinity of Y277A mutant for t-RA. The most striking differences were observed with synthetic retinoids. The Y277A mutation could somehow modify the ability of the receptor to wrap around compounds like Am580, a RAR α selective ligand, and certain antagonists like Ro 41-5253. There are other examples of mutations involving residues that, like Tyr²⁷⁷, do not lie in the LBP defined by crystallographic studies (4.5 Angströms cut-off distance from the ligand in the t-RA-RAR γ complex) and yet resulted in some modifications of the ligand specificity of the binding and/or transactivating properties of RARs. Their effects are very often restricted to certain synthetic retinoids. Recently, Lamour et al. (23) reported that the R217A and R294A RAR α mutants (located in the omega loop and at the beginning of helix H6) displayed an increased affinity for the RAR α selective antagonist Ro 41-5253. Similarly, Ostrowski et al. (26) observed that the R212Q RAR β mutant (a residue located in the omega loop and corresponding to Ser²¹⁹ in RAR α and Gln²²¹ in RAR γ respectively) presented wild type properties in the presence of various retinoids, with the exception of BMS-185411, a selective RAR β agonist and RAR α antagonist. BMS-185411 transactivated very poorly the R212Q mutant. The same effect was observed with the I232T and T246S RAR β mutants (corresponding to Thr²³⁹ and Thr²⁵³ in RAR α , two residues located in the H3 helix and the H3-H4 linker, respectively). Finally the mutation of Lys²²⁰ into alanine or glutamine in RAR β (a conserved residue of H3 corresponding to Lys²²⁷ in RAR α) was shown to result in the acquisition by the receptor of both retinol binding and retinol-dependent transactivating properties (21). Interestingly our Y277A mutant also acquired some affinity for retinol (Table III).

A conformational effect was also detected in the Y277A mutant by protease mapping. The impaired protection observed in the presence of t-RA is in agreement with the decrease in affinity and suggests that the conformational change of the mutant induced by the ligand was slightly different from the wild type. The most probably less compact folding of the mutant receptor could be responsible of the decrease in transactivation activity. Protease mapping has already been used with success by Keidel et al. (39) to document the specific mode of interaction

of Ro 41-5253, a RAR α antagonist, with the wild type receptor and by our group to detect alterations in the ligand-induced structural transitions in various RAR α mutants (32).

In conclusion we have evidenced the role of one of the three tyrosines of RAR α -LBD in its binding and transactivating properties. Tyr²⁷⁷, suspected to be essential for ligand-binding from the chemical modification experiments, was demonstrated by site directed mutagenesis and molecular modelization to be involved in the ligand-induced structural changes of the receptor and in the stabilization of its transcriptionnally active conformation. Protein chemistry and mutagenesis gave complementary informations supported by the available three-dimensional data. However, further work is clearly needed to understand how the RARs specifically interact with different synthetic retinoids.

Acknowledgments We are indebted to Dr. P. Lefebvre who provided us with TRE-pal -Luc reporter and β -RARE DR5 constructs. We also acknowledge Dr. P. Lefebvre and Ms F. Delporte for technical assistance, Pr. J.P Hénichart and Dr. P. Lefebvre for helpful discussion.

References

1. Gudas, L., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1994) in *The retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds) 2nd Ed., pp. 443-520, Raven Press, New York
2. Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994) in *The retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., eds) 2nd Ed., pp. 319-350, Raven Press, New York
3. Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., and Evans, R.M. (1987) *Nature* **330**, 624-629
4. Petkovitch, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987) *Nature* **330**, 444-450
5. Benbrook, D., Lernhardt, E., and Pfahl, M. (1988) *Nature* **333**, 669-672
6. Brand, N., Petkovitch, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1988) *Nature* **332**, 850-853
7. Krust, A., Kastner, P., Petkovitch, M., Zelent, A., and Chambon, P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5310-5314
8. Zelent, A., Krust, A., Petkovitch, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1989) *Nature* **339**, 714-717
9. Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Zelent, A., Leroy, P., Staub, A., and Chambon, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2700-2704
10. Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Kastner, P., Dierich, A., and Chambon, P. (1991) *EMBO J.* **10**, 59-69
11. Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.M., Ruffenach, F., Leroy, P., and Chambon, P. (1991) *EMBO J.*, **10**, 71-81
12. Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., and Thaller, C. (1992) *Cell* **68**, 397-406
13. Levin, A.A., Sturzenbecker, L.J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., and Grippo, J. (1992) *Nature* **355**, 359-361
14. Chambon, P. (1996) *FASEB J.* **10**, 940-954
15. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995) *Nature* **375**, 203-211
16. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* **375**, 377-382
17. Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.

- (1995) *Nature* 378, 681-689.
18. Klaholz, B.P., Renaud, J.P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1998) *Nature Struct. Biol.* 5, 199-202.
19. Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 87-94
20. Tairis, N., Gabriel, J.L., Gyda, M. III., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19516-19522
21. Tairis, N., Gabriel, J.L., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 18830-18837
22. Ostrowski, J., Hammer, L., Roalsvig, T., Pokornowski, K., and Reczek, P.R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1812-1816
23. Lamour, F.P.Y., Lardelli, P., and Apfel, C.M., (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 5386-5392
24. Wolfgang, C.L., Zhang, Z., Gabriel, J.L., Pieringer, R.A., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 746-753
25. Scafonas, A., Wolfgang, C.L., Gabriel, J.L., Soprano, K.J., and Soprano, D.R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11244-11249
26. Ostrowski, J., Roalsvig, T., Hammer, L., Marinier, A., Starrett Jr, J.E., Yu K.L., and Reczek, P.R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3490-3495
27. Tate, B.F. and Grippo J.F. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 20258-20263
28. Saitou, M., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19101-19107
29. Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. *EMBO J.* 13, 5370-5382
30. Lefebvre, B., Rachez, C., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1995) *Biochemistry* 34, 5477-5485
31. Lefebvre, B., Mouchon, A., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1998) *Mol. Cell. Endoc.* (In press).
32. Lefebvre, B., Mouchon, A., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1998) *Biochemistry* (In press).
33. Dallery, N., Sablonnière, B., Grillier, I., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1993) *Biochemistry* 32, 12428-12435

34. Rachez, C., Sautière, P., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17996-18006
35. Cavey, M.T., Martin, B., Carlavan, I. and Shroot, B. (1990) *Anal. Biochem.* **186**: 19-23
36. Sablonnière, B., Dallery, N., Grillier, I, Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1994) *Anal Biochem* **217**, 110-118
37. Boussif, O., Lezouac'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, V., and Behr, J.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7297-7301
38. Brasier, A.R., Tate, J.E., and Habener, J.F. (1989) *Biotechniques* **7**: 1116-1121
39. Keidel, S., LeMotte, P., and Apfel, C. (1994). *Mol. Cell. Biol.* **14**: 287-298
40. Drapeau, G.R. (1977) *Methods Enzymol.* **47**: 189-191
41. Inglis, A.S. (1983) *Methods Enzymol.* **91**: 324-332
42. Klein, E.S., Pino, M.E., Johnson, A.T., Davies, P.J.A., Nagpal, S., Thacher, S.M., Krazinski, G., and Chandraratna, R.A.S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 22692-22696
43. Sokolovski, M., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1966) *Biochemistry* **5**: 3582-3589
44. Conolly, M.L. (1983) *Science* **221** : 709-713

Abbreviations:

DMSO, dimethylsulfoxide ; DR5, direct repeat retinoic acid response element with a spacer of five bases; DTT, dithiothreitol; EMSA, electrophoretic mobility shift assay. HPLC/ESI-MS, High performance liquid chromatography-coupled electrospray ionization mass spectrometry; LBD, Ligand binding domain; LBP, ligand binding pocket; PEI, Polyethyleneimine; PMSF, Phenylmethanesulfonylfluoride; 9-*cis*-RA, 9-*cis*-retinoic acid; t-RA, all-*trans*- retinoic acid; hRAR, human all-*trans*-retinoic acid receptor; RARE, retinoic acid response element; hRXR, human 9-*cis*-retinoic acid receptor; TNM, tetranitromethane; TRE-pal, palindromic thyroid receptor response element.

Figure legends

Fig. 1. Inhibition of t-RA binding activity after treatment of RARs with tetranitromethane. Bacterial extracts containing the full length wild type hRAR α (A), hRAR β (B) and hRAR γ (C) were treated with the indicated concentrations of TNM for 2h on ice. Following reduction with DTT, t-RA binding was determined using 20nM ³[H]t-RA as described under "Materials and Methods". Protection was performed by preincubation for 16 hrs at 0°C with 1 μ M tritiated t-RA, before the addition of TNM. The specific t-RA binding was expressed as the percent of t-RA binding in the absence of TNM for each receptor (% of control binding). Values are mean \pm S.E. for three independent experiments performed in duplicate.

Fig. 2. Sequence of the ligand binding domain of hRAR α showing respective positions of Tyr²⁰⁸, Tyr²⁷⁷ and Tyr³⁶².

The three tyrosines present in the hRAR α -LBD are boxed. Helices 1 to 12, deduced by homology to RAR γ (17), are underlined. The aminoacids which are not conserved among all the three RARs are in italics. Residues supposed to belong to the RAR α -LBP (4.5 Angströms cut-off for Van der Waals interactions with t-RA in the holo RAR γ -LBD crystal) are in bold (17,19).

Fig. 3. DNA binding of wild type RAR α and mutant receptors. EMSA was performed using reticulocyte lysate extracts containing *in vitro* translated RXR α , wild type hRAR α (WT) or one of its tyrosine mutants as described under “Materials and Methods”. Equal amounts of RXR α and RAR α wild type receptor proteins (lanes 2-6 in A and lanes 2-4 in B), mutant Y208A (lanes 7-9 in A and lanes 5-6 in B), mutant Y277A (lanes 10-12 in A, lanes 7-8 and 11-13 in B), and mutant Y362A (lanes 13-15 in A and lanes 9-10 in B) were analyzed for DNA binding activity in the absence or in the presence of t-RA or CD367 as indicated in a gel retardation assay using a ³²P-labelled β -RARE-DR5 probe. Lane 1 in panels A and B contains unprogrammed lysate as a control. In lane 2 of panel A, a ³²P-labelled oligonucleotide unrelated to the β -RARE probe was used as non specific control. In lane 5 of panel A and lane 3 of panel B, a 50-fold excess of unlabelled probe was added to samples. The protein composition of the retarded complexes was determined by supershift experiments using monoclonal antibodies directed against RAR α (ab RAR α) or RXR α (ab RXR α). Supershifted complexes are indicated.

Fig.4. Effects of all-trans RA and CD367 on limited trypsin (A) or chymotrypsin (B) digestion of wild type and Y277A-hRAR α . The *in vitro*-translated wild type RAR α (WT) and the Y277A mutant were preincubated with DMSO alone or with 10⁻⁶ M t-RA or CD367. Samples were then digested with the indicated concentrations of trypsin (A) or chymotrypsin (B) and incubated for 10 min at room temperature (A) or 30 min at 37°C (B). Samples were analyzed by electrophoresis in a 10% SDS-polyacrylamide gel, and the dried gel was autoradiographed. The sizes of molecular weight markers are indicated.

Fig. 5. Accessibility and orientation of tyrosines in the RAR γ -LBD structure.

a) Ribbon drawing showing the holo RAR γ secondary structure. The coordinates are from Renaud et al. (Ref. 17 and Brookhaven Protein Database , entry 2LBD). Residues Y210, Y279 and Y364 (corresponding to Y208, Y277 and Y362 in RAR α) are represented. Note that Y277 is orientated opposite to the ligand.

b) Solvent accessible surfaces in the holo RAR γ -LBD of Tyr²¹⁰, Tyr²⁷⁹ and Tyr³⁶⁴ (in yellow). Phenol group is accessible in Tyr²¹⁰ and Tyr³⁶⁴ whereas only backbone atoms are accessible in Tyr²⁷⁹. Surfaces were calculated using the Quantum Chemistry Program Exchange N° 429 with five points per square angström and a probe radius of 1.4 Angströms (44). Molecular modelling was performed using a Silicon Graphics Indigo 2 station and Sybyl 6.4 software (Tripos, St Louis, MO).

Table I. Detection by HPLC/ESI-MS of hRAR α tyrosine containing peptides chemically modified by tetranitromethane.

	Receptor fragment	Mass predicted (Da)	Mass observed (Da)	Δ Mass
- RA	L ₂₀₅ -G-K-Y ₂₀₈ -T-T ₂₁₀	682.4	728	45.6
	F ₂₄₂ -A-K-.....-Y ₂₇₇ -T-P-E ₂₈₀	4364.4	4410	45.6
	A ₃₅₈ -L-K-V-Y ₃₆₂ -.....-K-I-T ₃₈₂	3083.7	3128	44.3
+RA	L ₂₀₅ -G-K-Y ₂₀₈ -T-T ₂₁₀	682.4	728	45.6
	D ₂₅₆ -Q-I-....-Y ₂₇₇ -T-P-E-Q-D ₂₈₂	3118.6	3118	0.6
	A ₃₅₈ -L-K-V-Y ₃₆₂ -.....-I-T-D ₃₈₃	3198.8	3244	45.2

The RAR α -LBD incubated or not with t-RA was subjected to nitration by TNM treatment and then to acetic acid and endoproteinase Glu-C hydrolysis. The peptide mixture obtained was analyzed by microbore reversed phase HPLC coupled to electrospray mass spectrometry (HPLC/ESI-MS). For each peptide, the mass predicted from the native sequence and the observed mass are reported. The theoretical Δ mass resulting from the nitration of one tyrosine residue is 44.98. The size of the receptor fragments obtained in the two sets of samples (-RA/+RA) was not exactly the same, a fact explained by our mild conditions of acid hydrolysis and proteolytic digestion (40,41). Cleavage at Gln²⁰⁴ and Asn²¹¹ probably resulted from deamidation of these residues into glutamic acid and aspartic acid residues, whereas cleavage at Asp²⁵⁶ and Glu²⁸⁰ was not always obtained. However the relevant peptides presented here were identified without ambiguity.

Table II

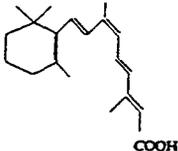
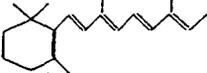
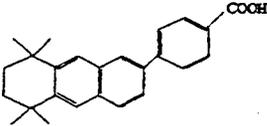
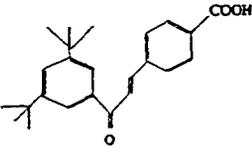
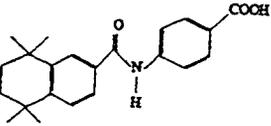
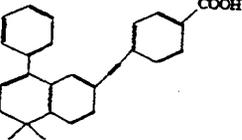
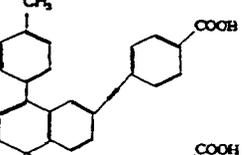
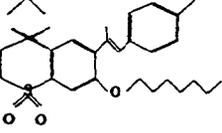
Comparison of K_d and EC_{50} for wild-type and mutant hRAR α

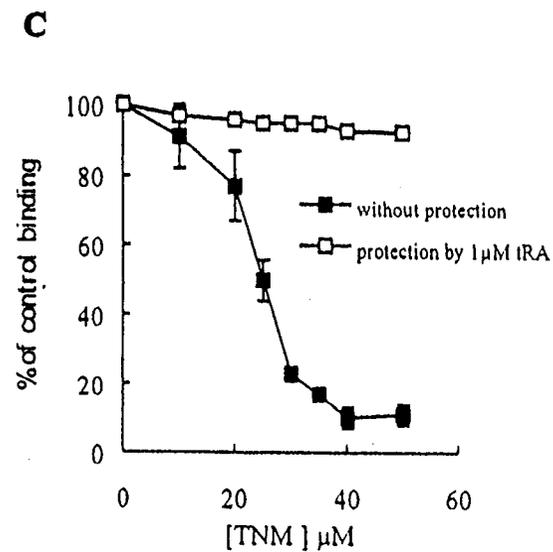
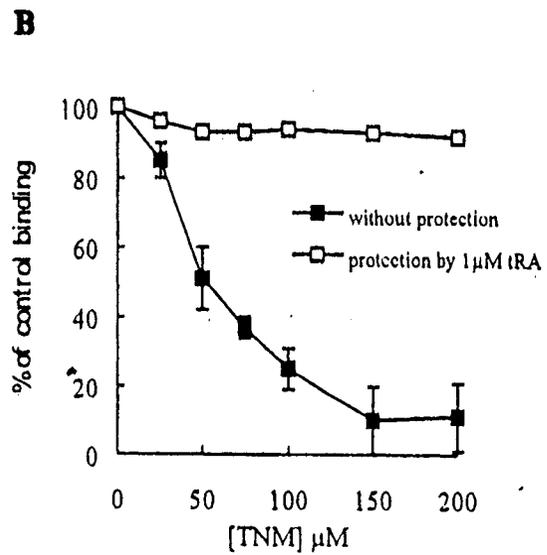
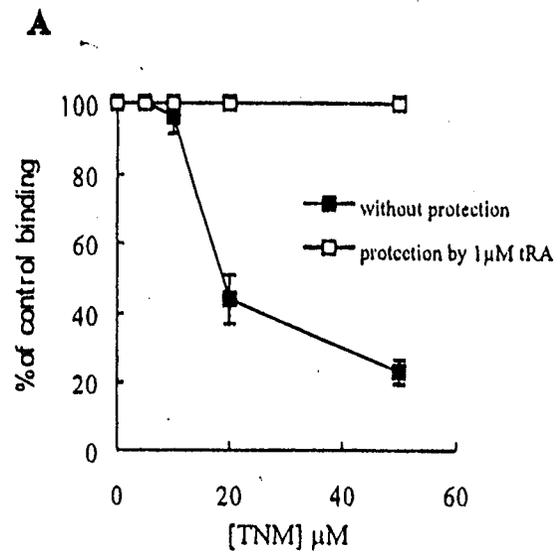
hRAR α	<i>All-trans</i> RA	
	K_d^a	EC_{50}^a
	nM	nM
Wild-type	3.5	39.3
Y208A	5	54.5
Y277A	53	848
Y362A	6	485

^a Mean of three experiments

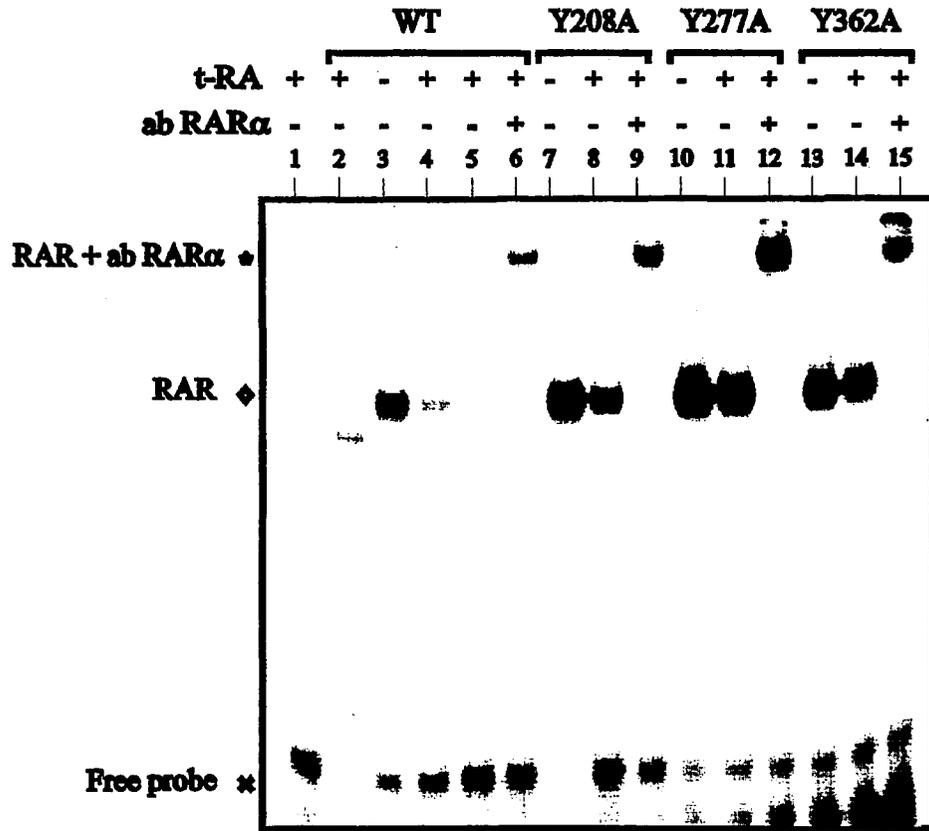
Table III

Ligand binding and transactivating properties of wild-type and Y277A-RAR α mutant. The K_i values (nM) were obtained by competition experiments. K_i and EC_{50} values are the mean of three experiments.

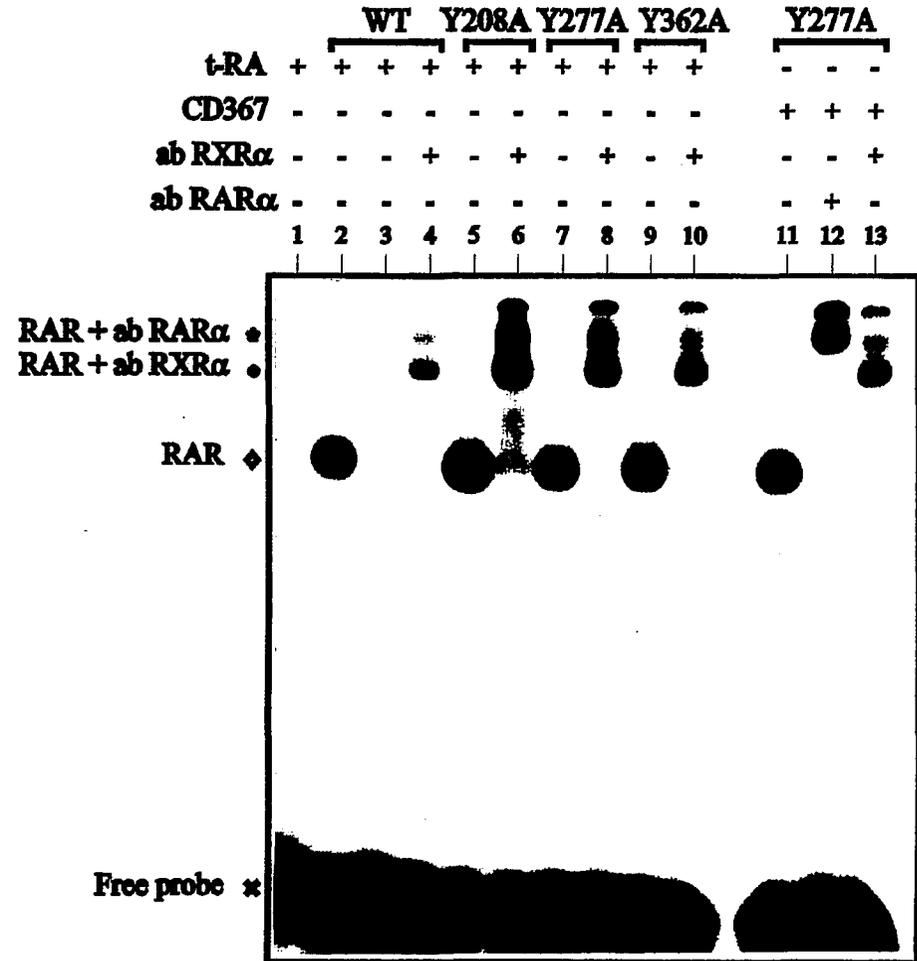
		hRAR α			
		Wild-type		Y277A	
		K_i (nM)	EC_{50} (nM)	K_i (nM)	EC_{50} (nM)
9c-RA		22	30	25	1000
retinol		>1000	>10000	502	>10000
CD367		14	33	1	>10000
Ch55		33	70	26	>10000
Am580		12	10	259	>10000
CD3105		108	>10000	26	>10000
CD3106		29	>10000	32	>10000
Ro41-5253		25	>10000	2	>10000



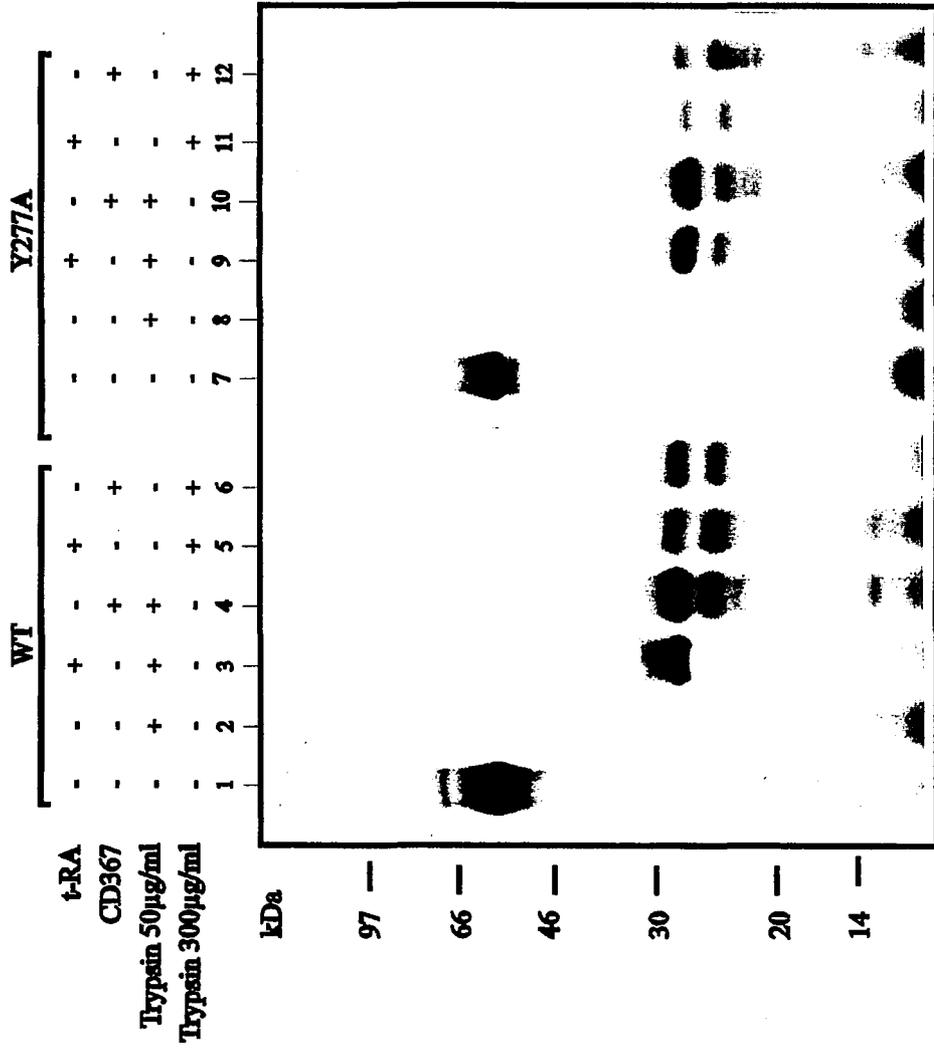
A



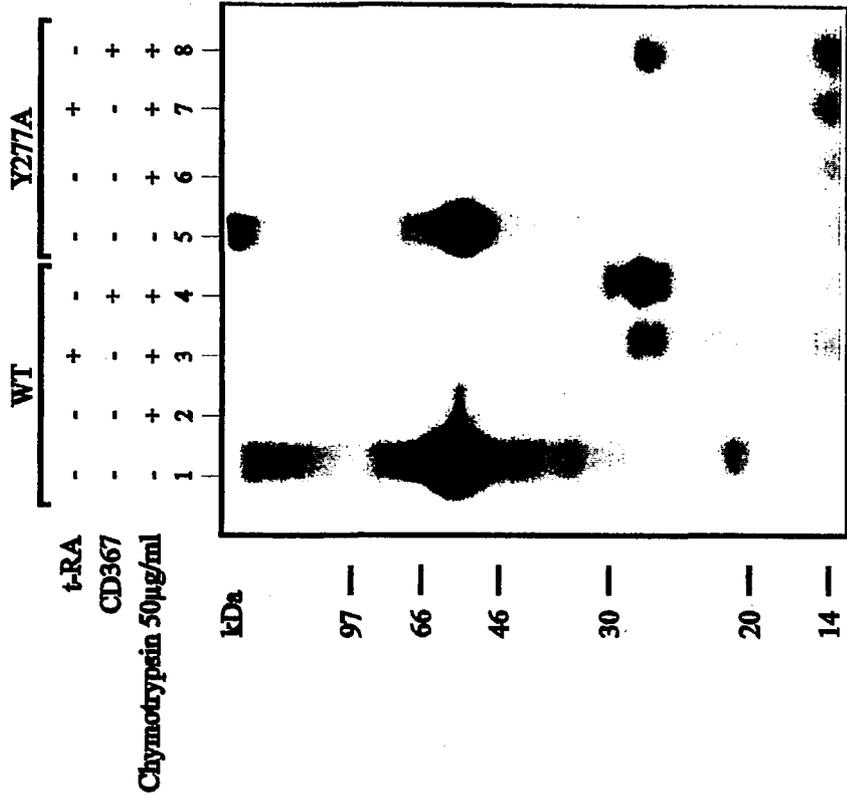
B

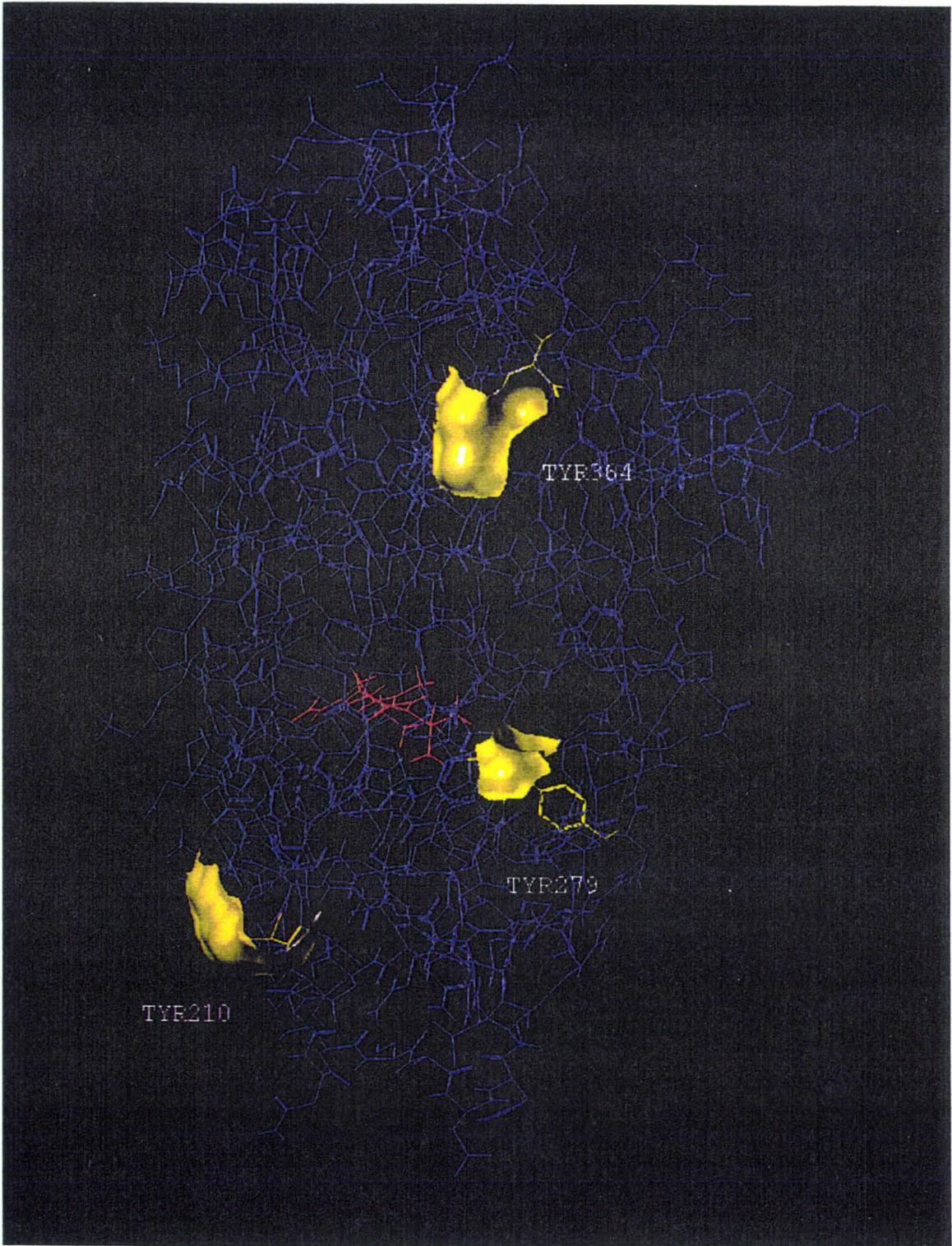


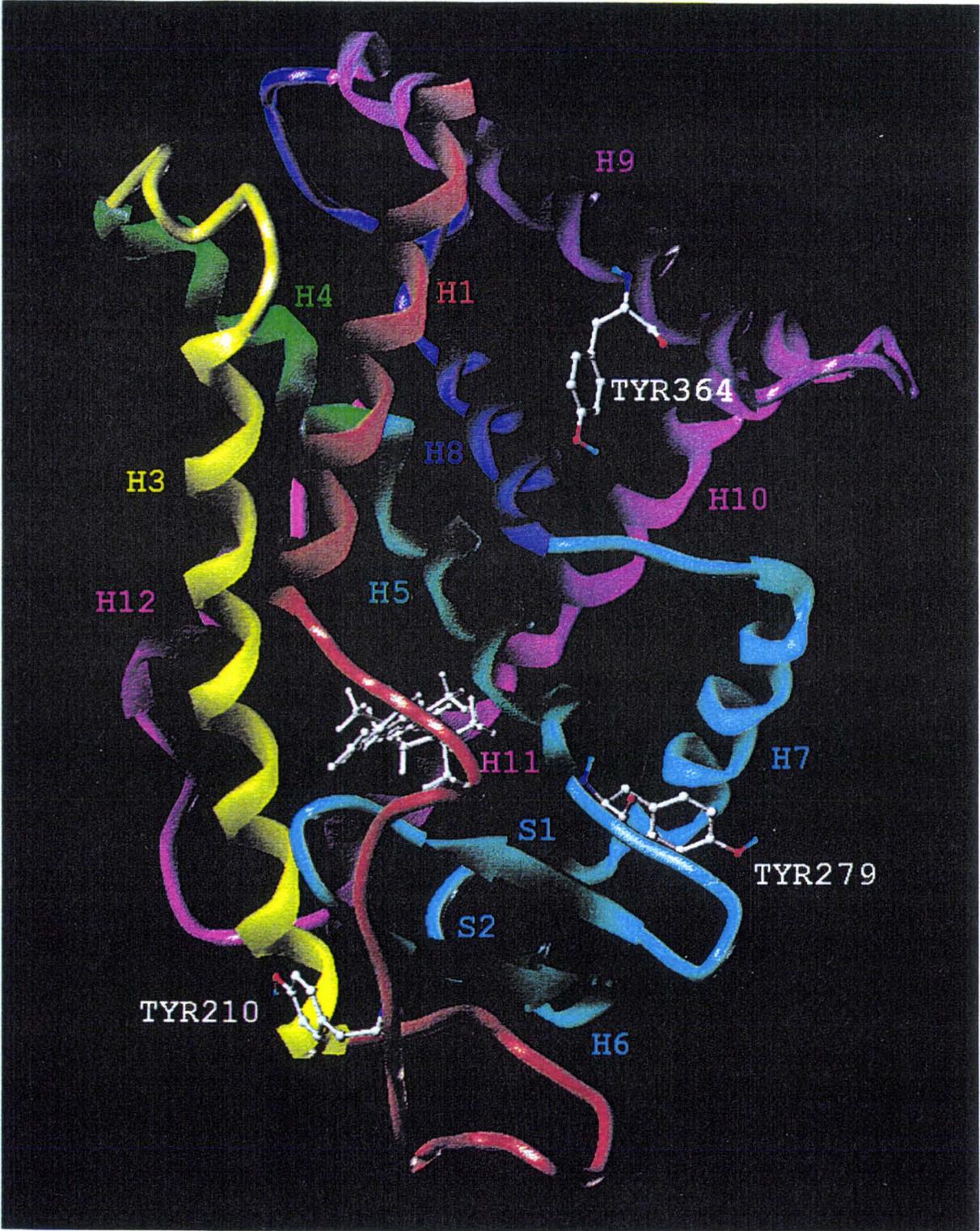
A



B







4.3. Discussion

4.3.1. Le TNM agit-il exclusivement sur les résidus de tyrosine ?

Le tétranitrométhane est un réactif chimique spécifique des résidus de tyrosine, néanmoins sur certaines protéines, il a la capacité de nitrer d'autres résidus comme ceux de cystéine, d'histidine et de tryptophane. Lorsque nous faisons réagir ce réactif sur notre protéine et qu'après hydrolyse chimique et enzymatique, nous analysons les peptides obtenus en spectrométrie de masse, nous observons pour certains peptides une différence de masse équivalente à la masse d'un groupement NO_2 or nous n'avons pas la certitude d'avoir nitré la tyrosine et pas un autre résidu d'acide aminé. Nous n'avons cependant pas pu séquencer les peptides identifiés en spectrométrie de masse (difficiles à purifier dans les conditions utilisées).

4.3.2. Utilisation de la spectrométrie de masse

Nos expériences ont été réalisées au Service Commun de Physicochimie de l'Université de Lille II sur un spectromètre de masse en mode électrospray.

4.3.2.1. Principe du spectromètre de masse en mode électrospray

Le spectromètre de masse est un appareil qui sert à mesurer avec une grande précision les masses moléculaires de macromolécules et en particulier de polypeptides. L'ionisation par électrospray est un procédé réalisé à pression atmosphérique au cours duquel des ions sont émis directement en phase gazeuse à partir de gouttes chargées. L'application d'une différence de potentiel élevée entre le site d'injection et la chambre de nébulisation du spectromètre de masse provoque la formation d'un faisceau de gouttelettes (ou "spray") très chargées positivement ou négativement selon la polarité du capillaire choisi. Le passage d'un flux d'azote évapore le solvant des gouttelettes et permet la formation d'ions. Ces ions sont alors introduits dans l'analyseur où ils sont séparés en fonction du rapport masse sur charge (m/z) avant d'atteindre le détecteur. La principale caractéristique de cette technique est la formation d'ions pseudomoléculaires polychargés $(M+nH)^{n+}$ en mode positif (les charges sont

apportées par des protons) et $(M-nH)^n$ en mode négatif (obtenues par déprotonation ou anionisation). En effet, comme le spectromètre de masse mesure les rapports m/z , une protéine par exemple, de 30 000Da et chargée 30 fois, apparaîtra sur le spectre à une valeur de 1001u.m.a. (unité de masse atomique), ce qui est à la portée de l'analyseur utilisé (la valeur limitée étant de 2400 u.m.a.). Les spectres obtenus en mode électrospray sont généralement constitués d'une série de pics correspondant à différents états de charges de la molécule.

4.3.2.2. L'approche par la spectrométrie de masse

En utilisant la SM, notre démarche consistait à analyser des peptides obtenus après coupure chimique et enzymatique du domaine de RAR α modifié par le TNM en présence et en absence du ligand naturel *t*-RA. Des essais avaient déjà été effectués auparavant par Nathalie Dallery au laboratoire pour tenter de déterminer la masse moléculaire du récepteur α ou du domaine E de RAR α . Cependant, bien que le nombre élevé de résidus basiques de RAR α ou du LBD soit tout à fait favorable à une bonne ionisation de la protéine, les résultats se sont avérés infructueux. De ce fait, nous avons abordé l'étude en soumettant le LBD de RAR α à une coupure chimique à l'acide acétique 0,25N puis à une coupure enzymatique par l'endoprotéase Glu-C (pour obtenir des fragments plus petits et ionisables).

4.3.2.3. Spectres obtenus

La difficulté résidait dans l'identification parmi la multitude de pics obtenus dans les spectres, des peptides qui nous intéressaient. En outre, il est vrai que l'acide acétique coupe en N- et en C-terminal de l'acide aspartique, cependant, en milieu acide, il peut se produire une désamidation de l'asparagine en acide aspartique ou alors une désamidation de la glutamine en acide glutamique. Par conséquent, de nouveaux sites d'hydrolyse se créent. De ce fait, les peptides contenant les résidus de tyrosine 208, 277 et 362 identifiés (grâce au logiciel MAC Biospec) nitrés par le TNM en absence de ligand ou protégés par le ligand ne sont pas forcément identiques et dépendent des sites de coupure obtenus. Lors de la nitration, une masse de 44.98Da, correspondant à la masse monoisotopique du groupement NO₂ remplaçant un atome d'hydrogène, est ajoutée à la masse attendue du peptide. Sur la figure 36, les deux spectres obtenus pour le peptide contenant la tyrosine 208 nitrée en absence et en présence de *t*-RA sont identiques. La masse du peptide observée est de 728 Da correspondant

à la masse du peptide additionné de la masse du groupement NO₂. En ce qui concerne les spectres des peptides contenant la tyrosine 277 (fig. 37), la masse observée du peptide Phe 242-Glu280 est de 4410Da [(1103,4x4)-4] ou [(883,0x5)-5] en absence de *t*-RA correspondant à la masse du peptide modifié par la nitration (4364.4 + 45.6). En présence de *t*-RA, la masse du peptide Asp256-Asp282 est de 3118Da [(1040,8x3)-3] correspondant à la masse du peptide non modifié. Pour les peptides contenant la tyrosine 362 (fig. 38), les masses obtenues représentent toujours les masses des peptides modifiés. Le peptide Ala358-Thr382 a une masse de 3128Da [(1043,6x3)-3] et le peptide Ala358-Asp383 de 3244Da [1082,6x3)-3] correspondant chacune à la masse du peptide contenant le groupement NO₂ de nitration (pour plus de détails sur l'analyse spectrale, conférer le tableau de la publication). De cette façon, comme seul le peptide de la tyrosine 277 est protégé par le ligand, nous avons supposé que la tyrosine 277 était impliqué dans l'interaction RAR α -*t*-RA. Néanmoins, cette technique étant très indirecte, il était indispensable de muter ces résidus d'acides aminés pour confirmer cette hypothèse.

4.3.3. Mutation des résidus de tyrosine du LBD de RAR α

Nous avons ainsi construits trois mutants en remplaçant les tyrosines 208, 277, 362 par un résidu d'acide aminé beaucoup moins encombrant et non chargé, un résidu d'alanine. Nous avons mesuré l'affinité de liaison au ligand de ces trois mutants et déterminé leur activité transcriptionnelle (en utilisant un gène reporteur, le TREpal-luc).

4.3.3.1. Technique de mesure de l'affinité de liaison

Ce paragraphe est un aparté pour souligner en quelques mots les difficultés que nous avons pu rencontrer lors de nos expériences de mesure d'affinité de liaison sur des extraits bactériens. L'affinité de liaison du récepteur exprimé est mesurée par la méthode au charbon-dextran. Cette technique par elle-même est très simple mais elle dépend surtout de la qualité et du rendement de la production bactérienne en récepteurs et de l'extraction protéique. Le système bactérien *E. coli* est basé sur la dérégulation d'un promoteur par l'IPTG qui permet ainsi l'expression de la protéine d'intérêt et le taux de production d'une culture à une autre n'est pas toujours constant. (Le même problème de production est rencontré dans les expériences de transfection transitoire). De plus, il est impossible de vérifier la conformation du récepteur et par conséquent le pourcentage de récepteurs fonctionnels parmi l'ensemble

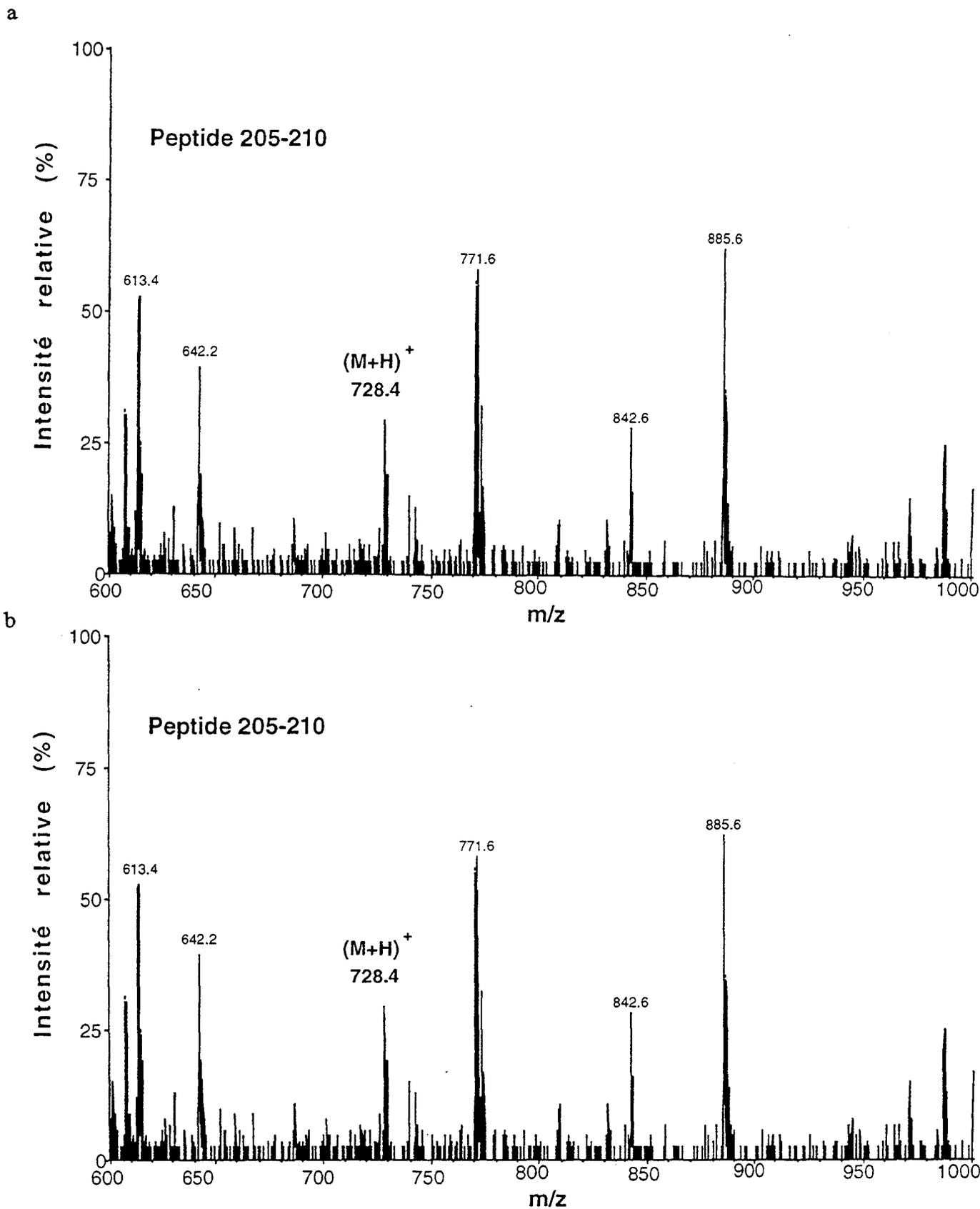


Fig. 36 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 208 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

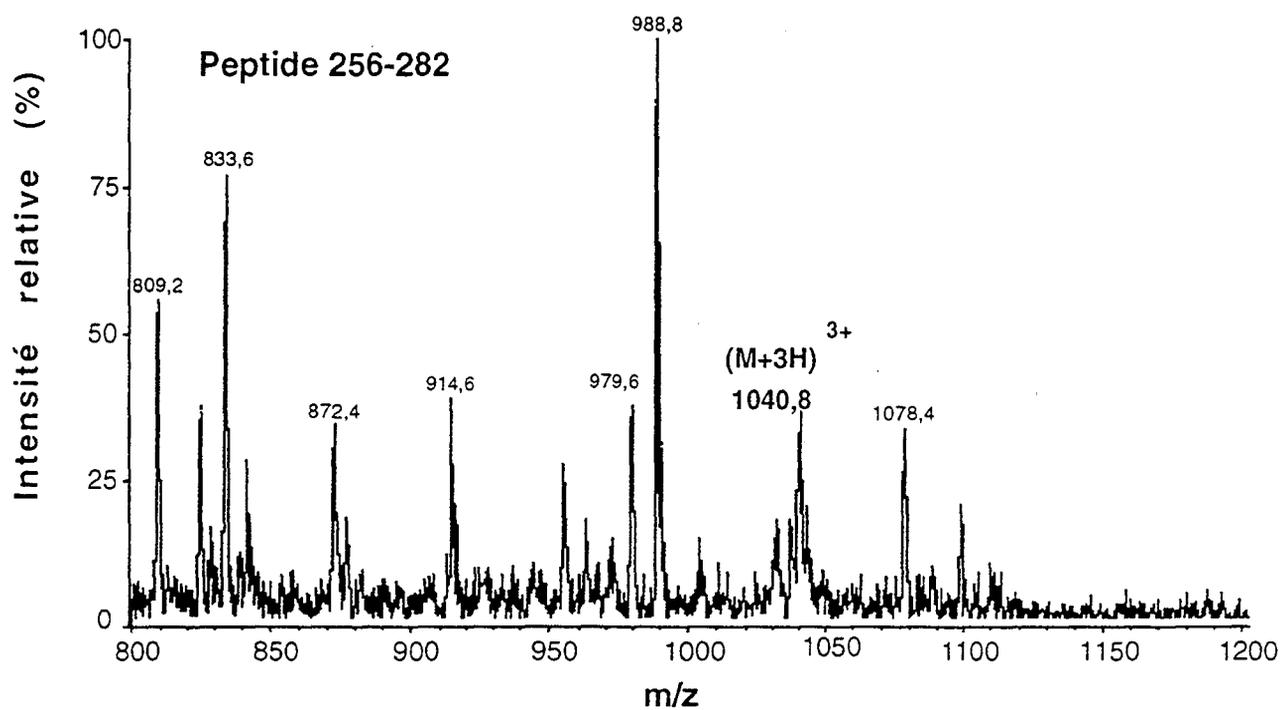
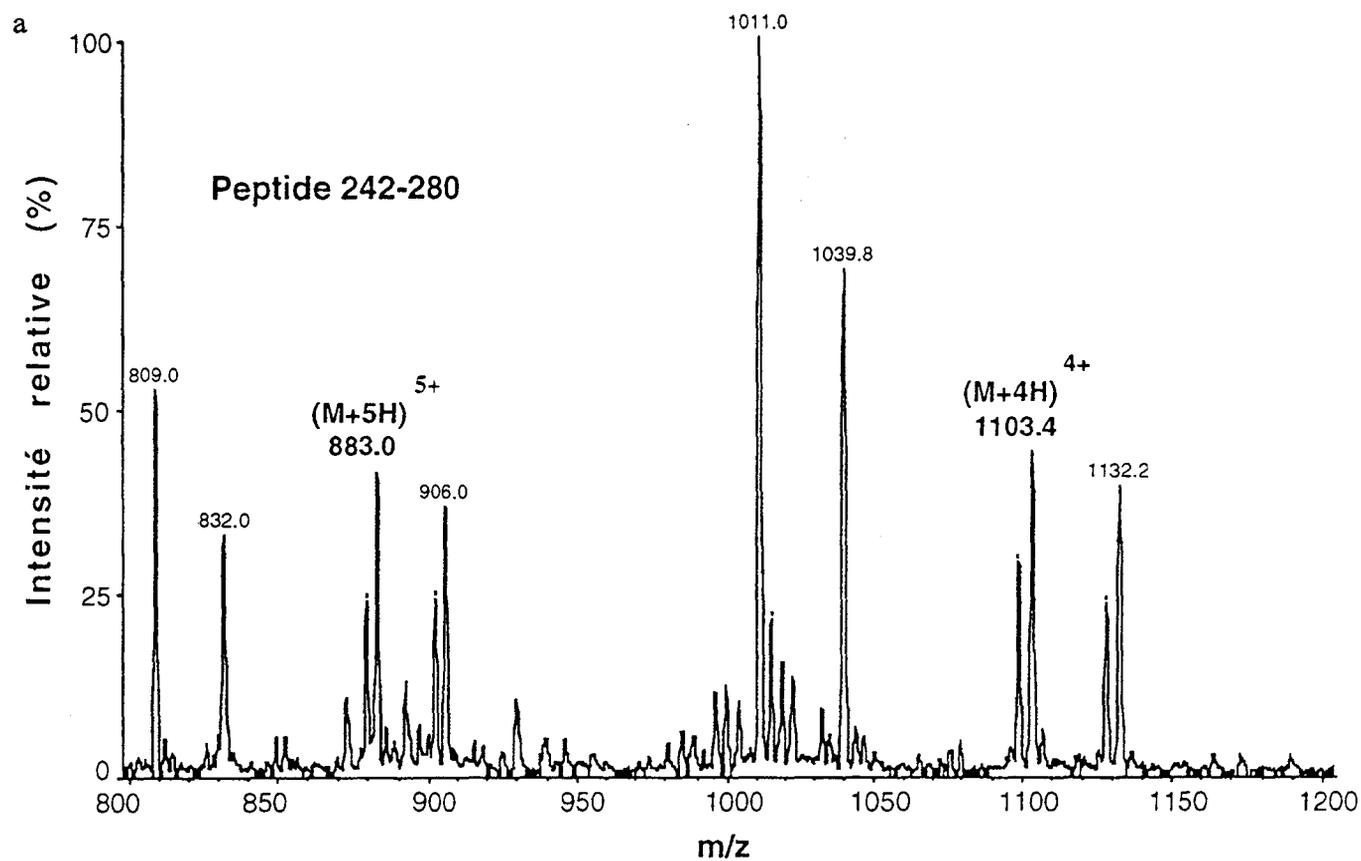


Fig. 37 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 277 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

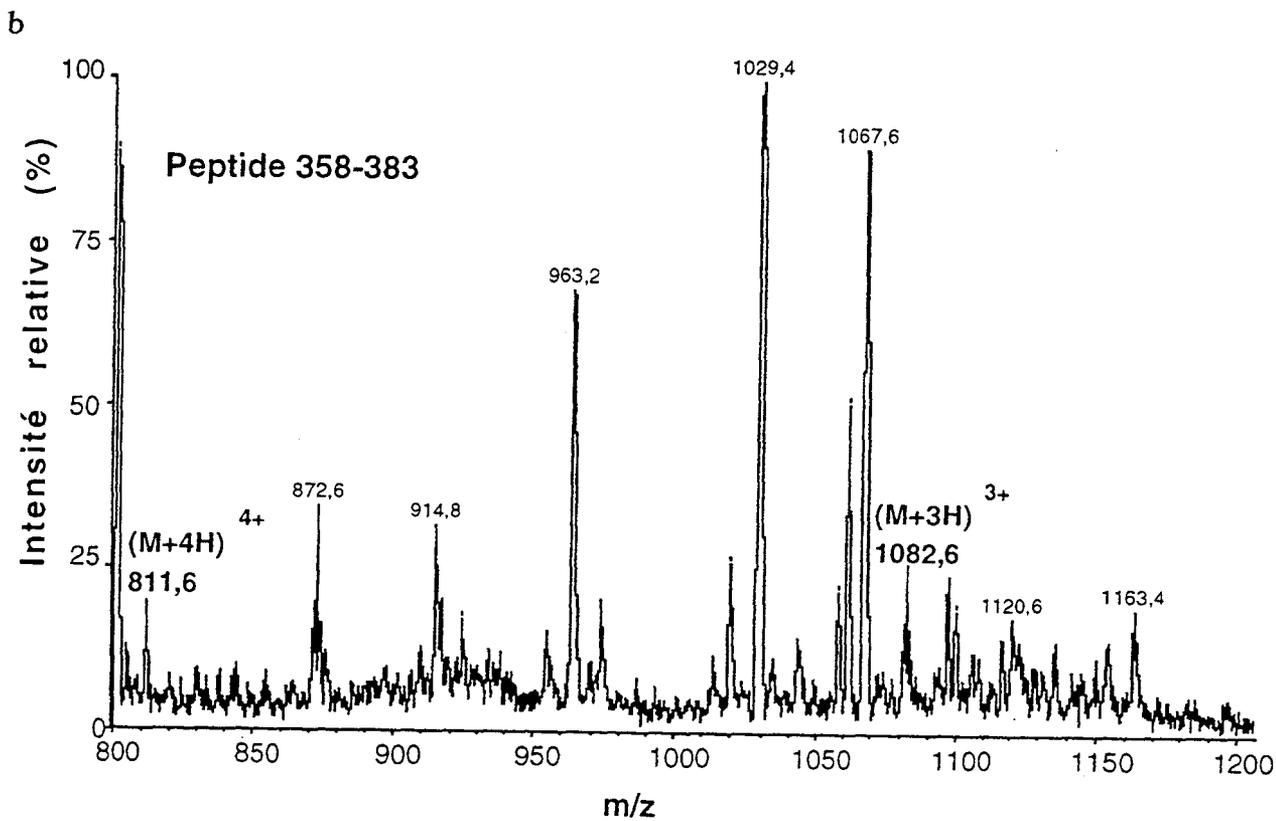
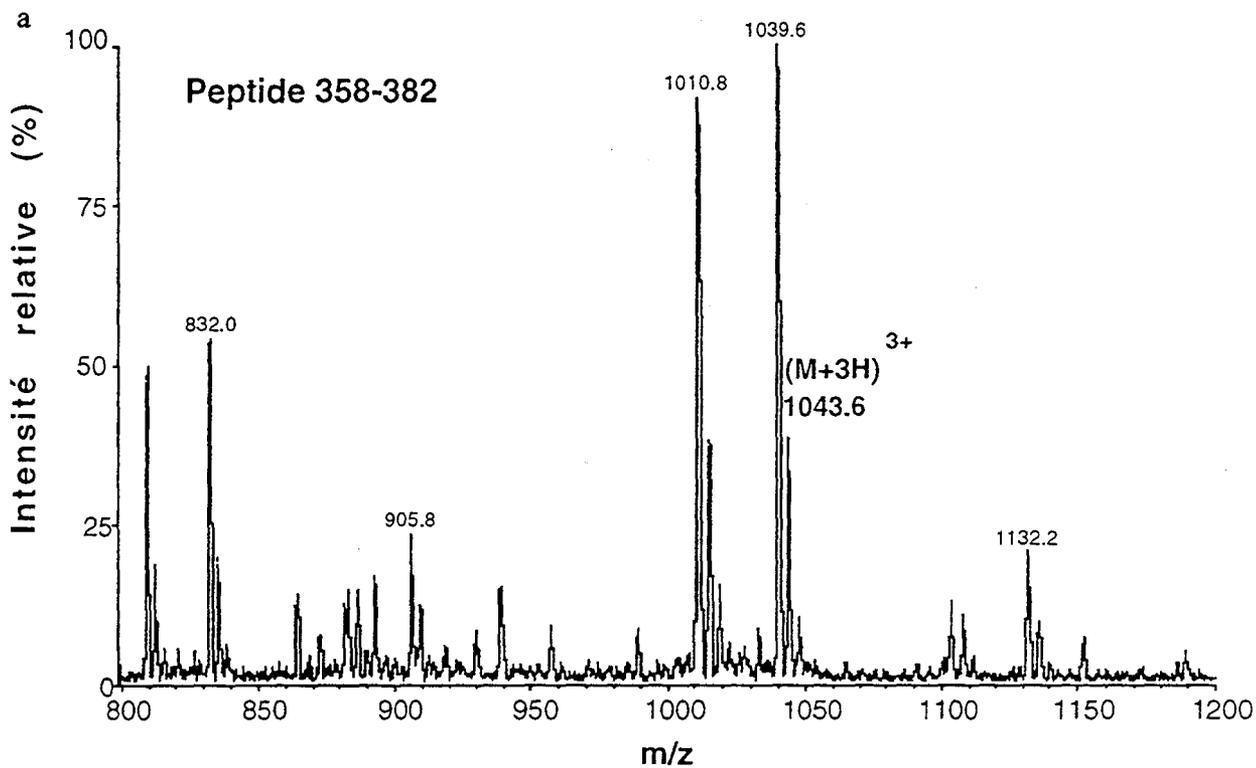


Fig. 38 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 362 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

des molécules de récepteurs produits dans l'extrait. Nous avons testé différentes méthodes d'extraction protéique afin d'obtenir des conditions optimales, applicables à l'expression de tous nos mutants. La première méthode est décrite dans la partie matériels et méthodes de l'article et reste très classique, la seconde est décrite dans l'appendice technique. Récemment, au laboratoire, une nouvelle technique a été mise au point pour déterminer la constante de dissociation de récepteurs nucléaires liés à leurs ligands (Benkoussa M. et *al.*, 1997). Cette méthode est basée sur la quantification de fragments séparés en gel SDS-page résistants à la digestion protéolytique par la trypsine sur le récepteur en présence du ligand. La quantité de fragments résistants à la trypsine est proportionnelle à l'occupation du récepteur par le ligand et permet la détermination de K_d . Cependant, bien que les valeurs obtenues par cette technique soient en accord avec les K_d obtenus par les méthodes classiques sur RAR α (et d'autres récepteurs nucléaires), elle n'est pourtant pas applicable à la détermination de K_d avec certains mutants. Certaines mutations comme celle de la tyrosine 277, dans notre étude, n'entraîne pas de différence dans le profil d'hydrolyse par la trypsine lorsque le récepteur muté est lié à *t*-RA ou au CD367 alors que l'affinité de liaison varie considérablement. De plus, cette technique est moins élégante et moins directe. Néanmoins, malgré de nombreux déboires mais avec beaucoup d'entêtement, nous avons surmonté un grand nombre de difficultés et réussi à obtenir des expériences reproductibles et interprétables.

4.3.3.2. Analyse de l'activité des mutants

Nous avons constaté que le mutant de la tyrosine 277 liait plus faiblement *t*-RA ($K_d=50\text{nM}$ comparé à 3.5nM pour RAR α) alors que les autres mutants conservent la même affinité de liaison vis-à-vis de *t*-RA que le récepteur sauvage. Ceci confirme le rôle important de la tyrosine 277. Nous nous sommes alors demandé si cette mutation entraînait également une perte d'affinité vis-à-vis du CD367 qui est un ligand agoniste de RAR α . Curieusement, nous avons obtenu un K_d de 3nM soit une forte affinité de liaison du récepteur muté Y277A pour le CD367. Par protéolyse limitée par la chymotrypsine, nous avons observé que le mutant Y277A se comportait différemment du récepteur sauvage notamment en présence de *t*-RA. En effet, aucune protection n'est observée. Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons émettre deux hypothèses : soit le domaine de liaison au ligand adopte une conformation telle que les sites d'hydrolyse deviennent accessibles à l'enzyme, l'hélice 12 ne pouvant refermer la cavité, soit la cinétique d'association-dissociation récepteur-ligand est affectée et *t*-RA se sépare plus rapidement du récepteur permettant l'hydrolyse par la chymotrypsine.

L'activité transcriptionnelle a également été mesurée pour chaque mutant. Pour le mutant Y277A, la conservation de l'activité antagoniste du Ro41-5253 et du CD3105 n'a pu être vérifiée compte tenu de la faible activité transcriptionnelle en présence de *t*-RA et du CD367. Tous ces résultats sont détaillés dans notre publication. Nous avons également constaté que le mutant Y362A possédait une très faible activité de transactivation induite par *t*-RA. Cependant, cette mutation n'affecte ni l'affinité de liaison du récepteur pour *t*-RA, ni la propriété de dimérisation avec RXR sur un élément de réponse de type DR-5 *in vitro* (vérifiée par gel retard). Cette tyrosine 362 qui se situe dans l'hélice 9 du domaine E de RAR α , ne correspond pas à un site potentiel de phosphorylation. Il est donc possible que sa mutation en un résidu alanine empêche un cofacteur essentiel à la transcription de venir se fixer et inhibe de cette façon l'activité de transactivation.

La mutagenèse dirigée est une technique assez directe pour vérifier si un résidu d'acide aminé est impliqué dans l'interaction récepteur-ligand. Cependant, elle présente un inconvénient. En effet le remplacement d'un résidu de tyrosine par un résidu d'alanine peut entraîner un changement de conformation local empêchant la liaison du ligand et il est alors impossible de déduire si ce résidu est directement impliqué dans l'interaction avec le ligand. Pour aller plus loin dans notre étude, il nous fallait un argument précis de positionnement. Les données de la cristallographie du LBD-hRAR γ étant disponibles, nous avons eu recours à la modélisation moléculaire pour répondre à différentes questions restées en suspens : La tyrosine 277 se trouve-t-elle dans la LBP ? Est-elle orientée vers le ligand ? Peut-elle être nitrée dans le site de liaison ?

4.3.4. Utilisation du modèle moléculaire du LBD-hRAR γ

4.3.4.1 Position des résidus de tyrosine dans le LBD de RAR γ et accessibilité au solvant

Ce travail a été effectué au laboratoire de Chimie Pharmaceutique dirigé par le Pr. Lesieur à la Faculté de Pharmacie, grâce aux compétences du Dr. P. Chavatte. La modélisation moléculaire nous a permis de visualiser la position de nos trois résidus de tyrosine, leur orientation et leur accessibilité pour la nitration dans RAR γ . Les tyrosines 208 et 362 (210 et 364 dans RAR γ) sont situés à la surface du domaine de liaison au ligand, par

contre la tyrosine 277 (279 dans RAR γ) se trouve enfouie à l'intérieur du site mais elle n'est pas du tout dirigée vers le *t*-RA. La seule surface accessible au solvant de ce résidu se situe au niveau de son squelette carboné. Son cycle phénolique se trouve à l'intérieur de la structure dans une petite cavité. Pour qu'une liaison hydrogène puisse se former, une distance comprise entre 0.8 et 2.8Å entre deux groupements et un angle de 120° sont nécessaires. Dans un environnement de 4Å, aucun résidu voisin de Tyr 279 ne peut établir de liaison hydrogène avec cette acide aminé. Nous nous sommes alors posés la question, s'il était malgré tout possible de greffer un groupement NO₂ sur ce résidu. Le phénol de Tyr 279 est au voisinage de Pro 281, Asp 284 et Phe 312. En nitrant la tyrosine et en tenant compte du volume de Van der Waals de chacun de ces résidus, il apparaît un encombrement stérique entre le groupement NO₂ de la tyrosine 279 et la chaîne latérale de la leucine 319 (fig. 39). Par conséquent, la tyrosine 279 ne peut pas être modifiée à cause de son enfouissement et sa non accessibilité. Ces données confirment celles obtenues par spectrométrie de masse. En outre, nous pouvons en déduire qu'il existe une différence de conformation entre l'apo-RAR α (la tyrosine 277 étant accessible à la nitration) et l'holo-RAR α .

4.3.4.2. Comparaison avec le modèle de RXR α

Par les expériences d'inactivation chimique et par l'étude par la spectrométrie de masse, nous avons constaté qu'en absence de ligand, RAR α après action du TNM ne pouvait plus lier *t*-RA et que les trois résidus de tyrosine étaient nitrés. Comme la conformation du récepteur est modifiée par la fixation du ligand, la tyrosine 277 qui se trouve enfouie à l'intérieur du domaine de liaison doit être placée plus en surface dans l'apo-RAR α . Comme la seule structure cristallographique des récepteurs des rétinoïdes disponible en absence de ligand est celle de RXR α , nous nous sommes demandés si par comparaison, nous ne pourrions pas visualiser l'accessibilité des résidus correspondants aux résidus de tyrosine lorsque le ligand n'est pas encore fixé. La tyrosine 208 de RAR α correspond à l'alanine 252 dans RXR α , Tyr 277 à Ser 317 et Tyr 362 à Tyr 403. Or, par modélisation moléculaire, en réalisant les surfaces de Conolly, nous avons observé qu'aucun de ces résidus n'est accessible au solvant dans l'apo-RXR α (fig. 40). RXR α adopte donc une conformation générale similaire à RAR γ mais les comparaisons résidu par résidu entre ces deux récepteurs sont impossibles à réaliser.

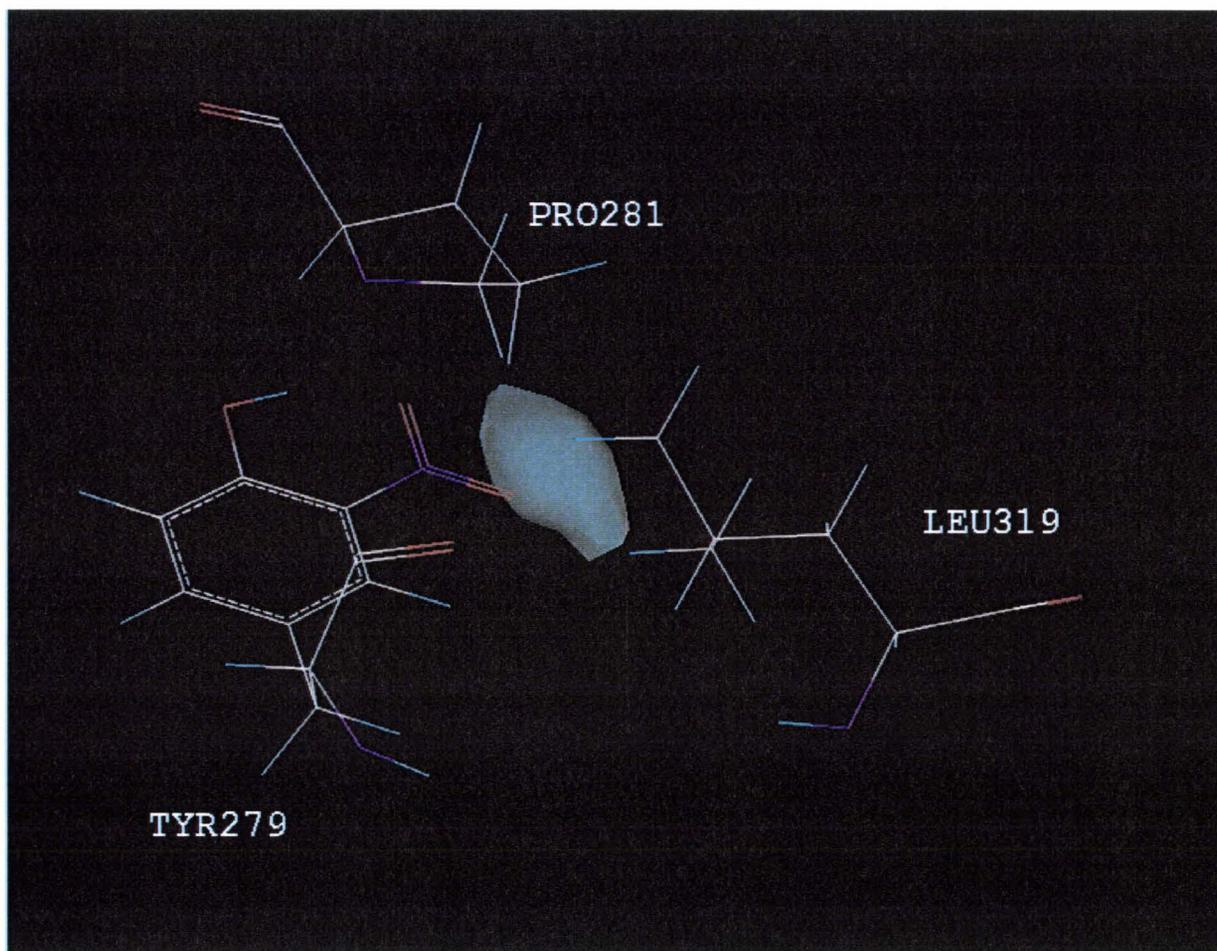


Fig. 39 : Encombrement stérique entre le groupement NO₂ de la tyrosine 279 nitrée et la chaîne latérale de la leucine 319

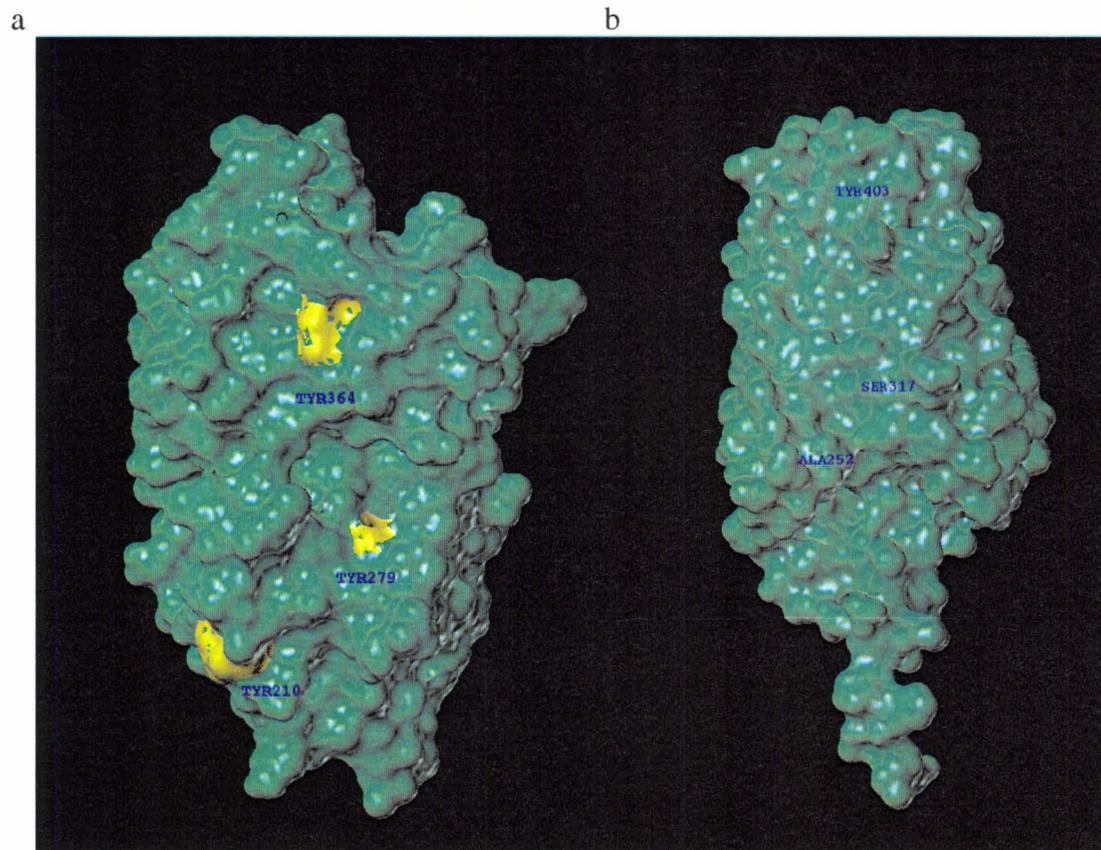


Fig. 40 : Surfaces de Conolly montrant l'accessibilité au solvant des trois résidus de tyrosine 210, 279 et 364 (en jaune) sur le LBD-hRAR γ (a) et les acides aminés correspondant sur le LBD-RXR α (b)

4.2.4.3. La cystéine 267 de RAR β et la tyrosine 277 de RAR α

Dans l'étude sur les cystéines (Wolfgang C.L. et *al.*, 1997), l'approche employée avec les réactifs chimiques spécifiques est comparable aux travaux que nous avons réalisés sur les résidus de tyrosine. De ce fait, il nous semblait intéressant d'étudier par modélisation ces résidus de cystéine. De plus, la cystéine 267 dans RAR β correspondant à la cystéine 276 dans RAR γ se situe à proximité de la tyrosine 279. Comme un tour d'hélice équivaut approximativement à 3.6 résidus d'acides aminés, cette cystéine est orientée de la même manière que notre tyrosine 279, position vérifiée sur le modèle moléculaire du LBD-hRAR γ (fig. 41). La cystéine 276 n'interagit donc pas directement avec le ligand, ce qui explique que le K_d de 0.6nM obtenu avec *t*-RA pour le mutant C276A soit identique au K_d du récepteur sauvage. Cette cystéine de par sa position doit agir de la même façon que la tyrosine 279.

4.2.4.4. Etude des deux résidus de cystéine de Wolfgang C.L. et *al.*

Selon les hypothèses de Wolfgang C.L. et *al.*, la cystéine 267, accessible seulement au réactif MMTS, se trouve dans la LBP de RAR β à proximité du groupement carboxyle de *t*-RA, alors que la cystéine 228 modifiable aussi bien par le DNTB que par le MMTS, se positionne à 4Å de *t*-RA, plus à l'entrée de la LBP (Wolfgang C.L. et *al.*, 1997). Nous avons tenté de vérifier ces données par une approche par la modélisation moléculaire sur le LBD-hRAR γ . Les surfaces de Connolly de ces deux résidus de cystéine montrent que la cystéine 276 est seulement accessible au solvant au niveau de son groupement carboxyle alors que la cystéine 237 l'est au niveau de sa chaîne latérale (fig. 42). Dans la LBP, la cystéine 276, à une distance de 5Å à partir son C α , est entourée des résidus 272 à 278 appartenant à l'hélice 5, de l'alanine 315 et de la leucine 318 de H7. Elle forme une liaison hydrogène avec la méthionine 272 (fig. 43a). Ce résidu est déterminant dans la liaison des ligands spécifiques de RAR γ (Klaholz B.P. et *al.*, 1998). La cystéine 276 joue donc probablement de manière indirecte un rôle dans la sélectivité de liaison des ligands. Nous remarquons que ce résidu se trouve dans une cavité et qu'il est possible, par construction sur ce modèle statique, de greffer un groupement substituant d'acide thiobis(2-nitrobenzoïque) sans gêne stérique apparente. Par contre, pour la cystéine 237 entourée des résidus 233 à 241 (H3), de la leucine

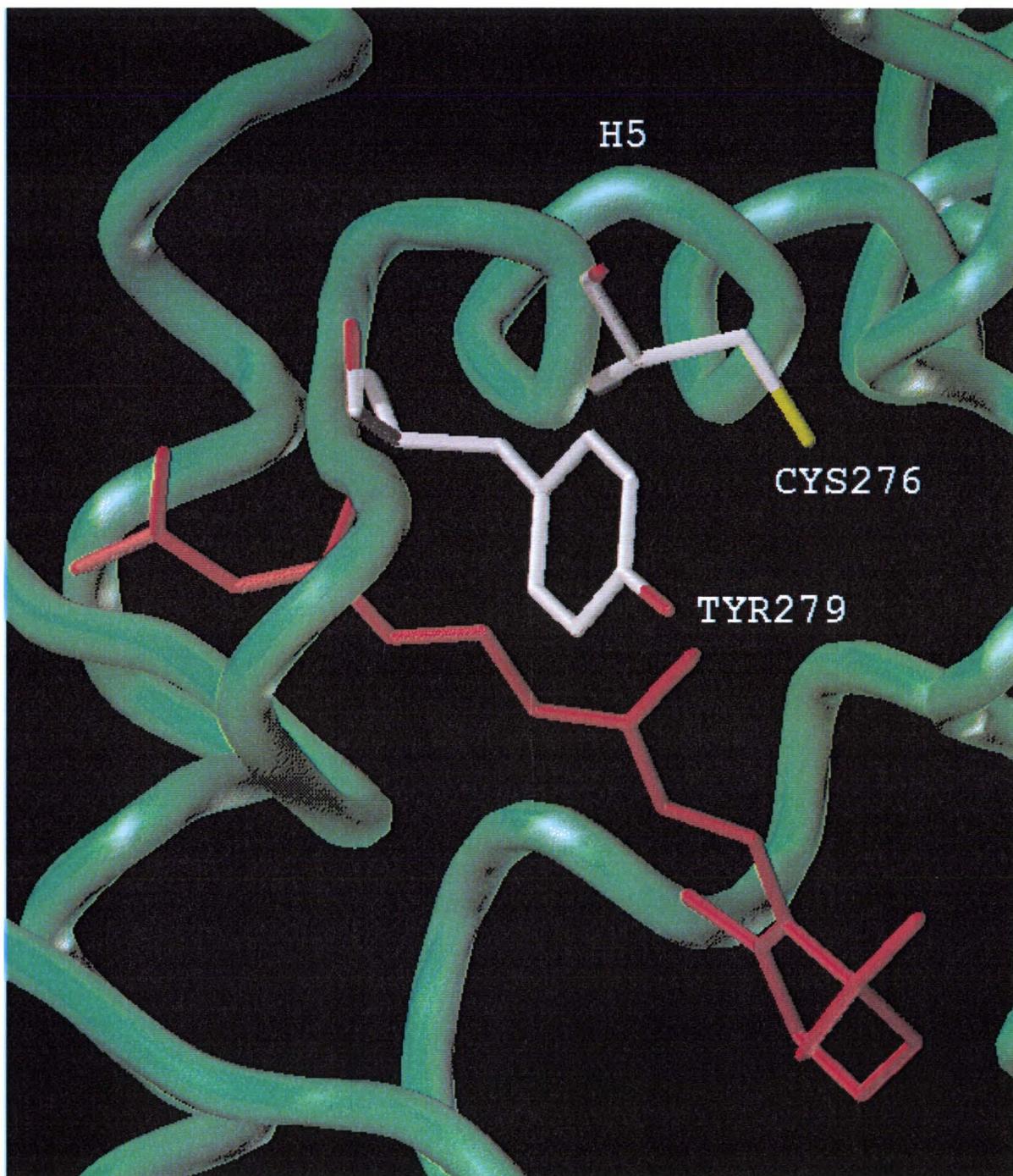


Fig. 41 : Position de la cystéine 276 par rapport à la tyrosine 279 dans le LBD-hRAR γ (modélisation moléculaire)

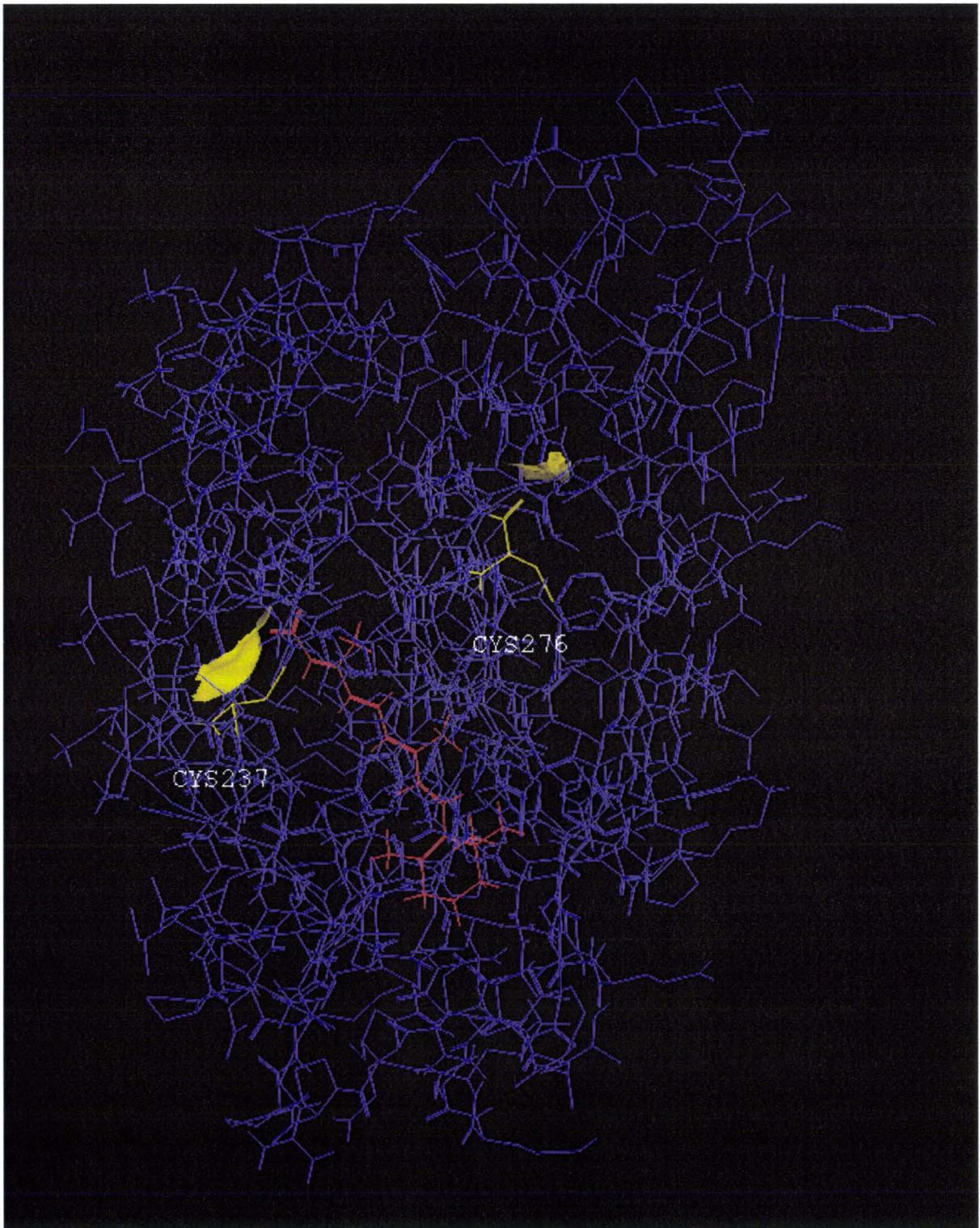
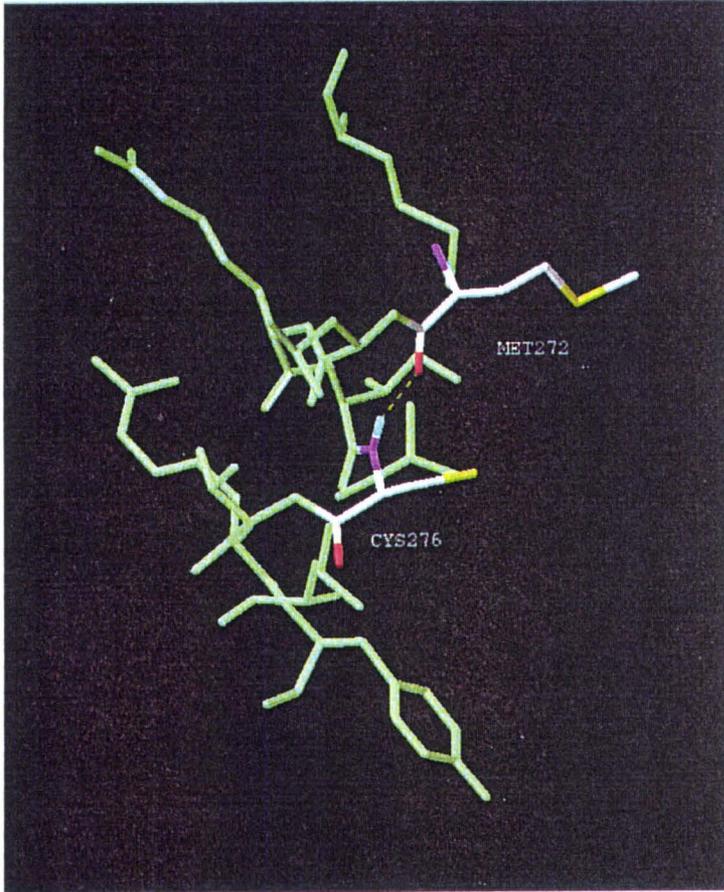


Fig. 42 : Surfaces de Conolly pour les résidus de cystéine 237 et 276

a



b

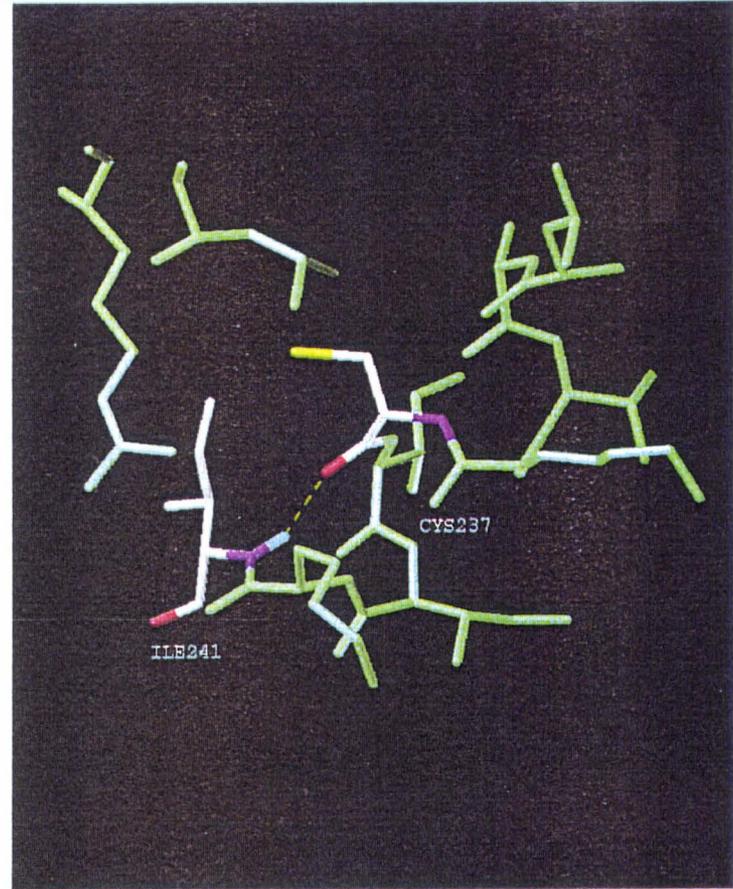


Fig. 43 : Acides aminés à 5Å du carbone α de la cystéine 276 (a) et de la cystéine 237 (b)
(Modélisation moléculaire sur le LBD-hRAR γ)

271 et de l'arginine 274 (H5) (fig. 43b), nous avons constaté que l'ajout de ce même groupement entraînait dans les conformations coûtant le moins d'énergie, une gêne stérique soit avec Arg 274, soit avec Leu 271. L'ajout d'un groupement thiométhyle (pour la modification par le MMTS) est également impossible. Ainsi, comme nous l'avons démontré grâce à la nitration de la tyrosine 277 sur l'apoRAR α , l'exposition au solvant de ces résidus est différente au sein de l'apo et de l'holoRAR. Ceci permet de comprendre les résultats obtenus à la suite des modifications chimiques de ces cystéines. La cystéine 228, comme dans l'holo-LBD-RAR γ , doit être accessible dans l'apo-RAR β au DTNB. Lorsque *t*-RA vient se fixer, comme le groupement substituant d'acide thiobis(2-nitrobenzoïque) est encombrant, il entraîne un positionnement différent des acides aminés de la LBP et empêche le récepteur de prendre sa véritable conformation holo. Par contre, en ce qui concerne la cystéine 276, deux hypothèses sont possibles. Soit cette cystéine n'est pas accessible à la modification chimique par le DTNB comme sur l'holo-RAR γ , soit elle est accessible sur l'apo-RAR β et alors le groupement substituant d'acide thiobis(2-nitrobenzoïque) vient se positionner dans une cavité assez vaste sans beaucoup perturber la conformation de la LBP. Compte tenu de ces deux conformations du récepteur en absence et en présence de ligand, les expériences d'inactivation chimique ne démontrent pas qu'un résidu interagit avec le ligand mais seulement que ce résidu se trouve à proximité de la LBP et que sa modification entraîne un changement de conformation défavorable à la liaison.

4.2.5. Mutation du résidu de tyrosine 277 par une phénylalanine

Comme le résidu de tyrosine 277 est un acide aminé déterminant dans l'interaction récepteur-ligand, nous avons voulu savoir si le groupement hydroxyle de ce résidu de tyrosine participait à la conformation du site de liaison de RAR α en présence du ligand. Pour cela nous avons muté la tyrosine 277 en phénylalanine. Nous avons mesuré son affinité de liaison pour le *t*-RA et le K_d obtenu est de 4.2nM (fig. 44). Comme cette affinité de liaison reste de même ordre que celle du récepteur sauvage, nous pouvons en déduire que ce groupement hydroxyle n'interagit avec aucun résidu voisin. Ces résultats sont confirmés par la modélisation moléculaire sur RAR γ , grâce à laquelle nous avons pu observer que ce résidu n'établissait aucune liaison avec un acide aminé voisin ou avec le ligand. Néanmoins, comme chaque ligand possède une activité différente selon sa structure, nous avons réalisé des expériences de compétition contre le *t*-RA tritié avec les différents ligands testés sur le mutant Y277A. Or, quel que soit le ligand utilisé, le K_I est du même ordre que celui du récepteur

sauvage (tab. 9). Ceci signifie donc que cette mutation ne perturbe pas l'affinité de liaison pour les différents ligands, le groupement OH de la tyrosine n'étant pas indispensable à la conformation du récepteur induite par la liaison du ligand.

II. ETUDE DU ROLE DES RESIDUS :GLY 301, PHE 302, GLY 303 ET LEU 266 DANS L'INTERACTION RAR α -LIGAND

Au-delà de l'étude des résidus de tyrosine du domaine de liaison au ligand, nous nous sommes intéressés à la topographie du site de liaison de RAR α . La structure cristallographique de l'holo-LBD-hRAR γ a permis d'identifier les résidus d'acides aminés de la poche de liaison en présence de *t*-RA (Renaud J.P. et *al.*, 1995). Cependant, pour l'heure, peu d'études ont montré le rôle de ces acides aminés dans la liaison et l'activation du récepteur avec des ligands agonistes et antagonistes de structure chimiquement différente.

1. Le choix des résidus d'acides aminés mutés

Comme le domaine E de l'holo-RAR γ a été cristallisé (Renaud J.P. et *al.*, 1995), il est désormais possible d'avoir une idée plus précise sur la conformation adoptée du domaine de liaison en présence du ligand. A partir de ces données et grâce à la modélisation moléculaire de RAR α réalisée par le CIRD Galderma dans le cadre d'une collaboration, nous nous sommes intéressés aux résidus d'acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison de ligands spécifiques. En se basant sur le modèle de hRAR α , quatre de ces résidus ont alors été choisis pour être testés après mutation pour leur affinité de liaison vis-à-vis de certains ligands et pour leur activité transcriptionnelle. Trois résidus, Gly 301, Phe 302 et Gly 303, se situent entre l'hélice 6 et l'hélice 7. Cette région semble particulièrement impliquée pour l'activation du récepteur lors de la fixation du ligand. En effet, en comparant les deux modèles : l'apo-LBD-hRXR α et l'holo-LBD-hRAR γ , nous avons constaté que le repositionnement de H12 nécessitait le déplacement de H6 et que par conséquent, la boucle entre H6 et H7 jouait un rôle de charnière. En outre, les deux résidus, Gly 301 et Phe 302, entretiennent des contacts étroits avec le gem-diméthyle de *t*-RA (4.5Å et 4Å respectivement). De ce fait, la mutation de ces résidus d'acides aminés pourrait entraîner un effet sur l'affinité de liaison et sur l'activité antagoniste de molécules de la famille du CD2665 (fig. 45). Le quatrième résidu d'acide aminé que nous avons étudié, la leucine 266, se situe au début de l'hélice 5. Cette hélice appartient à la poche de liaison et la leucine 266

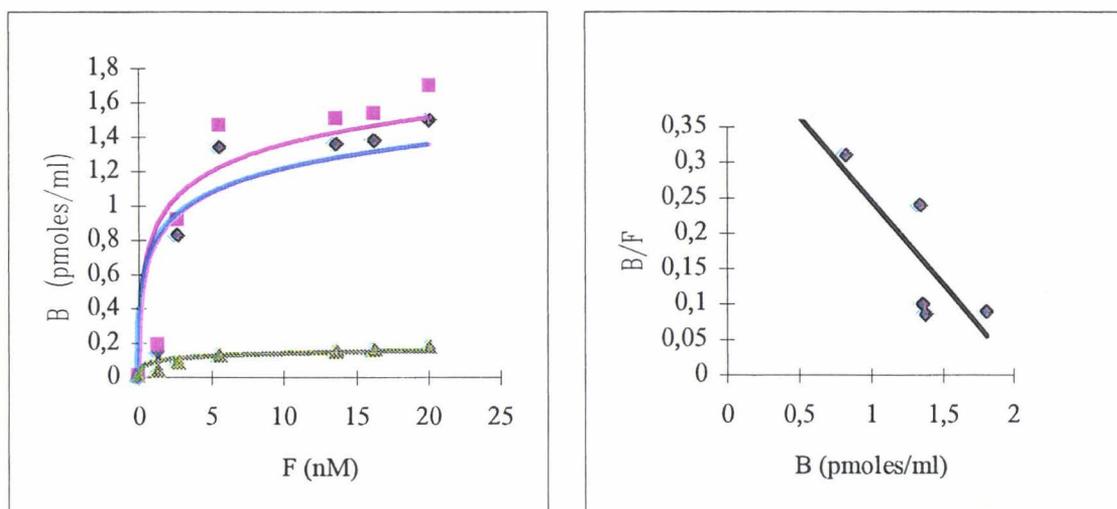
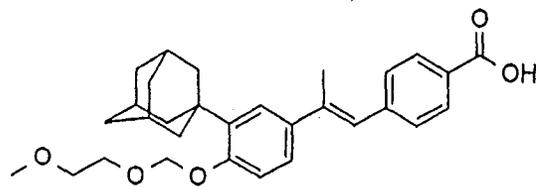


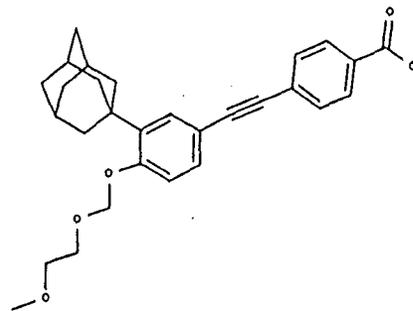
Fig. 44 : Courbes de saturation et de Scatchard du mutant Y277F avec *t*-RA

	RAR α	hRAR α -Y277F
Ligand	K _I (nM)	K _I (nM)
CD367	14	63
Am580	12	52
Ch55	33	52
CD3105	108	89
Ro41-5253	25	35

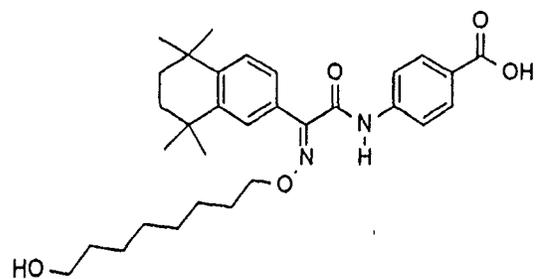
Tab. 8 : Mutant Y277F : K_I obtenu par compétition contre *t*-RA tritié



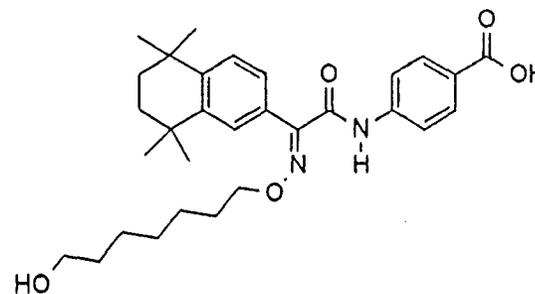
CD2905



CD2331



CD2815



CD2817

Fig. 45 : Ligands de la famille du CD2665 (CD2905 et CD2331) et de la famille du CD2668 (CD2815 et CD2817)

semble directement interagir avec le méthényle 7 de *t*-RA. Sa mutation pourrait diminuer l'affinité de liaison et perturber l'activité antagoniste de molécules de la série du CD2668 (fig. 45).

2. Résultats

Nous avons donc muté ces quatre résidus en les remplaçant par un résidu d'alanine. Nous avons ensuite déterminé leur affinité de liaison pour *t*-RA puis pour différents ligands (K_d obtenus par des expériences de compétition contre *t*-RA tritié): le CD367 et le TTNPB agonistes des RARs, l'Am580 spécifique de RAR α , le CD2905 et le CD2331, antagonistes appartenant à la famille du CD2665, le CD2815 et le CD2817, antagonistes appartenant à la famille du CD2668, le CD3106 agoniste inverse de RAR α , le CD3105 et le Ro 41-5253 antagonistes de RAR α . La plupart de ces ligands nous ont été fournis par le CIRD Galderma. En parallèle, nous avons effectué des expériences de transactivation sur un gène reporteur TRE-pal-luc de chacun de ces mutants avec les différents ligands.

2.1. Affinité de liaison des récepteurs mutés pour différents ligands

L'affinité de liaison et l'activité de transactivation des mutants avec les différents ligands sont résumées dans le tableau 10. Ainsi, nous remarquons que les mutants G301A, F302A et L266A lient assez bien *t*-RA avec un K_d de 15.4nM, 16.5nM et 22nM respectivement comparé à 3.5nM pour le récepteur sauvage. Le mutant G303A par contre, a une affinité de liaison légèrement plus faible ($K_d=36$ nM). D'autre part, l'affinité de liaison des mutants G301A, F302A et G303A impliquant les acides aminés de la région charnière H6-H7, est dans l'ensemble fortement diminuée pour les ligands de synthèse agonistes et antagonistes testés. En ce qui concerne le mutant L266A, l'affinité de liaison est aussi considérablement réduite excepté pour deux antagonistes, le Ro41-5253 et le CD2815.

2.2. Activité transactivatrice des mutants

Les expériences de transactivation ont été réalisées avec le gène reporteur TRE-pal-luc. Le pourcentage d'activité de transactivation a été déterminé en prenant comme référence l'activité induite par 10^{-6} M de *t*-RA (100%). Pour chacun de ces mutants, l'activité de transactivation induite par les différents ligands reste en général proportionnelle à leur

		WT		G301A		F302A		G303A		L266A	
		K_i (nM)	% transactivation	K_i (nM)	% transactivation	K_i (nM)	% transactivation	K_d (nM)	% transactivation	K_d (nM)	% transactivation
	K_d avec tRA	3.5	100	15.4	71	16.2	75	36	58	22	97
	CD367	14	75	2000	57	543	35	448	59	326	40
	Am580	12	55	>1700	25	347	36	872	53	>3000	69
	TTNPB	24	57	181	47	510	28	89	34	1540	51
Famille CD2665	CD2905	120	24	1677	4	3010	5	>3000	17	>3000	6
idem	CD2331	766	24	1762	6	3186	6	>3000	7	>2000	16
Famille CD2668	CD2815	950	34	>2600	17	>2700	10	>3000	17	396	10
idem	CD2817	888	41	2029	14	>2700	5	>3000	13	1551	13
antago	CD3105	108	16	236	20	2711	24	469	27	>3000	39
ago inverse	CD3106	29	14	>2600	35	973	17	>3000	29	450	35
antago	Ro41-5253	24	0	1520	0	3219	8	2387	1	12	0

Tab. 9 : Affinités de liaison différentielles et activité de transactivation des mutants G301A, F302A, G303A et L266A. Détermination des K_d en nM avec *t*-RA et mesures indirectes (K_i) pour les autres ligands. Les valeurs de transactivation sont rapportées à 100% correspondant à l'activité du récepteur sauvage en présence de 10^{-6} M de *t*-RA

capacité de liaison, excepté bien évidemment pour les composés antagonistes. Nous nous sommes alors demandés si pour le mutant F302A et surtout pour le mutant L266A, les ligands antagonistes conservaient leur propriété. Nous avons donc réalisé des expériences de transactivation en introduisant une concentration constante de 10^{-8} M de *t*-RA et des concentrations croissantes en ligand antagoniste. Avec F302A, nous avons testé le CD2905 et le CD2331 alors que pour L266A, nous avons utilisé le CD2815, le CD2817 et le Ro41-5253 (Fig. 46). Nous avons constaté que l'effet antagoniste de ces ligands avec les récepteurs mutés était comparable à celui obtenu avec le récepteur sauvage. Pour le CD2905 et le CD2331, un excès d'environ 100nM par rapport à *t*-RA est nécessaire pour obtenir 50% d'inactivation de l'activité agoniste sur RAR α et RAR α -F302A. De même pour le CD2815 et le CD2817 sur RAR α et RAR α -L266A. Le Ro41-5253 est un antagoniste plus puissant, un excès de 40nM est suffisant pour inhiber l'action de *t*-RA. Pour le mutant F302A, bien que la mutation affecte la liaison du CD2905 et du CD2331 (25 fois et 4 fois plus faible respectivement que sur RAR α), leur activité antagoniste n'est pas affectée. Pour le mutant L266A, la mutation augmente l'affinité de liaison du CD2815 et du Ro41-5253 mais l'activité d'inhibition de la transactivation reste identique à celle observée sur le récepteur sauvage.

3. Discussion

3.1. Rôle des résidus au niveau de la boucle H6-H7

Grâce à ces expériences, nous avons donc mis en évidence que la mutation de la glycine 301, de la phénylalanine 302 et de la glycine 303 en alanine engendre une perte d'affinité de liaison considérable du récepteur pour la plupart des ligands, confirmant le rôle déterminant de ces résidus au niveau de la charnière H6-H7. En outre, il a été montré que la mutation dans RAR α de Gly 301 en arginine (Durand B. et *al.*, 1994) et de Gly 303 en acide glutamique (Saitou M. et *al.*, 1994) entraîne une perte de l'affinité de liaison pour *t*-RA. Il est néanmoins intéressant de noter que vis-à-vis de *t*-RA, l'activité de liaison de nos mutants reste assez proche de celle du récepteur sauvage. Ceci peut peut-être s'expliquer par le fait que le *t*-RA possède une structure assez souple comparée à celle des autres ligands synthétiques qui conservent une conformation assez rigide. En outre, en regardant la structure des ligands utilisés, nous constatons que chez le CD367, l'Am580, le TTNPB, le CD2815 et le CD2817, le cyclohexène de *t*-RA est remplacé par un groupement naphthalène. Comme la structure de ces ligands est alors plus rigide que celle de *t*-RA, la mutation des acides aminés

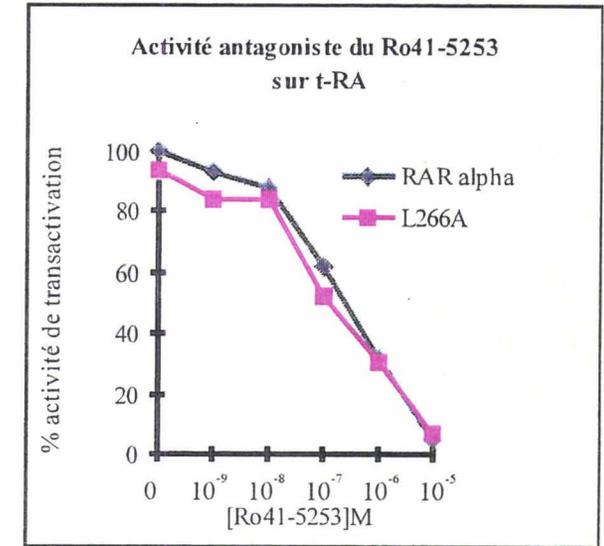
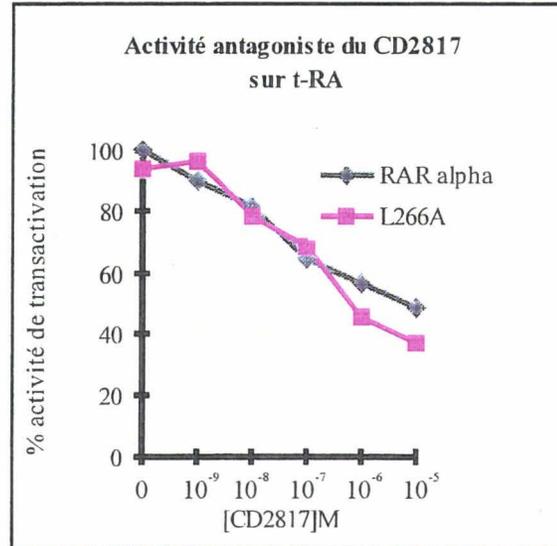
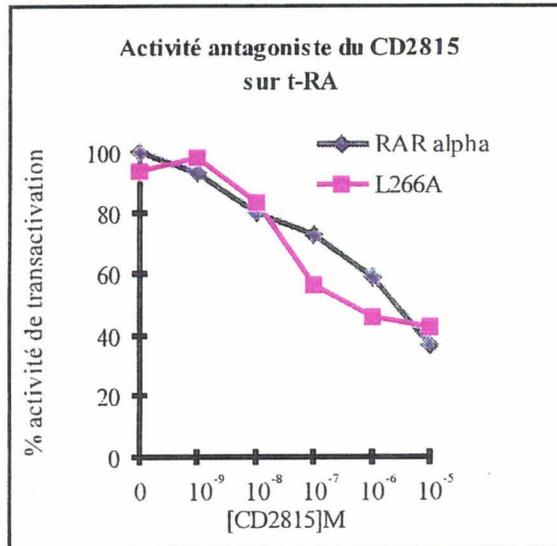
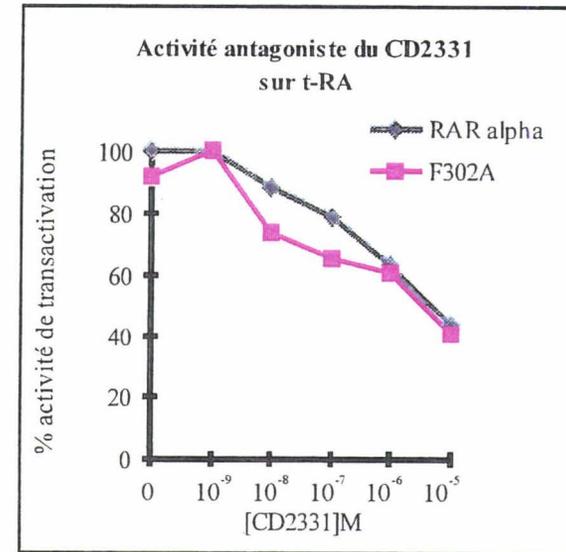
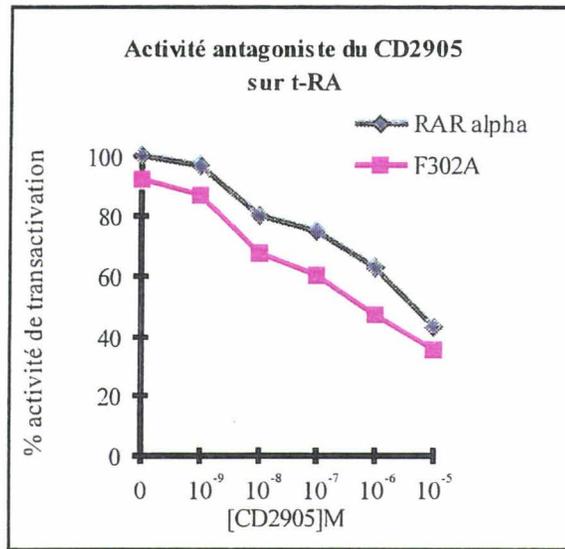


Fig. 46 : Détermination de l'activité antagoniste de ligands spécifiques par rapport à *t*-RA (10nM) sur le récepteur sauvage et les mutants hRAR α -F302A et-L266A en utilisant le gène reporteur TRE-pal-luc.

de la boucle H6-H7 empêche probablement la formation de liaison hydrogène avec les fonctions gem-diméthyles des ligands. Avec les ligands antagonistes, CD2905, CD2331, CD3105 et CD3106, l'affinité de liaison est également fortement diminuée. Selon le modèle d'Ostrowski J. et *al.*, positionnant le BMS185411, ligand antagoniste de RAR γ , dans le site de liaison, il apparaît que le groupement phényle substituant en ortho du cycle β -ionone de ce ligand se place près de H12 (Ostrowski J. et *al.*, 1998). Nous supposons alors que le CD3105 et le CD3106 se positionnent de la même façon dans la poche de liaison. De plus, la présence d'un groupement méthyle substituant supplémentaire en position 4 du phényl du CD 3106 semble responsable d'une affinité de liaison des mutants plus faible qu'avec le CD3105. La mutation des acides aminés de la région H6-H7 doit donc perturber le positionnement de l'hélice 12 en présence de ligands rigides et fortement substitués. Avec les ligands de la famille du CD2665, qui sont substitués par un groupement adamantyle et une chaîne latérale éther, le même raisonnement peut être suivi. Néanmoins, leur positionnement dans le site de liaison en fonction de leurs groupements substituants n'est pas défini.

3.2. Effet de la mutation L266A

3.2.1. La liaison avec les ligands agonistes

De par sa position dans l'hélice 5 par rapport à *t*-RA (4.5Å) et sa proximité de Ile 270 spécifique de la sélectivité de RAR α , nous nous attendions à ce que la mutation de Leu 266 en alanine diminue considérablement l'affinité de liaison du récepteur muté pour le *t*-RA et les divers ligands testés. Cette hypothèse s'est vérifiée pour les différents ligands agonistes synthétiques. Cependant, *t*-RA se lie assez bien au mutant. Or, tout comme l'alanine, la leucine est un résidu hydrophobe et son remplacement n'entraîne probablement qu'une perturbation locale au niveau de H5. Le *t*-RA qui a une structure beaucoup plus flexible que les autres ligands agonistes de synthèse, s'adapte sûrement à ce changement de conformation.

3.2.2. Implication du résidu de leucine 266 dans le mécanisme antagoniste?

Cette leucine semble plus particulièrement impliquée dans le mécanisme d'action des antagonistes. En effet, sa mutation en alanine entraîne une perte d'affinité de liaison pour tous les ligands synthétiques excepté pour les deux antagonistes Ro41-5253 et CD2815. La

structure du CD2815 ne diffère de celle du CD2817 que par la configuration du groupement hydroxyle à l'extrémité de la chaîne latérale substituante. Ainsi, une différence très fine dans la structure chimique de la molécule permet d'obtenir deux comportements de liaison différents. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par Lamour F.P.Y. et *al.*, qui en mutant l'arginine 217 et l'arginine 294 de RAR α en alanine, ont trouvé une affinité de liaison accrue pour le ligand antagoniste Ro41-5253 (Lamour F.P.Y. et *al.*, 1996). Le changement de conformation imposé par la fixation d'un ligand antagoniste est de nature différente de celui généré par un ligand agoniste. Il se peut que la leucine 266 qui se trouve dans l'hélice 5 contribue au mécanisme antagoniste. Cependant, avec le CD2817 ou le CD3105, l'affinité de liaison du mutant L266A est 2 fois ou 30 fois inférieure à celle du récepteur sauvage. Par cette observation, nous pouvons émettre l'hypothèse que le mécanisme conformationnel supposé, induit par un antagoniste, même de structure assez proche d'un autre antagoniste, n'est pas un mécanisme unique et qu'il peut solliciter des acides aminés différents. Dans la littérature, la plupart des résultats obtenus, notamment par protéolyse limitée en présence de ligands agonistes ou antagonistes sur le récepteur de l'acide rétinoïque, vont dans le sens d'un mécanisme conformationnel unique induit par la fixation d'un antagoniste (Keidel S. et *al.*, 1994, Wagner B.L. et *al.*, 1996). De même, avec le récepteur des glucocorticoïdes, le profil de digestion du récepteur non activé ou activé par une série de 6 antagonistes structurellement différents n'est pas toujours identique (Modarress K.J. et *al.*, 1997). Le changement de conformation de l'extrémité C-terminale du domaine E de GR serait indépendant de l'activité antagoniste du ligand. Ceci confirmerait l'existence de différentes conformations spécifiques des récepteurs stéroïdiens selon les ligands antagonistes.

3.3. Position de ces résidus dans le modèle LBD-hRAR α

Sur la figure 47, les quatre acides aminés étudiés sont positionnés dans la LBP de RAR α . La modélisation moléculaire a été réalisée par le Dr. E. Thoreau. La vue est prise à partir de H12. Nous constatons que comme sur le modèle de hRAR γ , la glycine 301, la phénylalanine 302 et la leucine 266 s'orientent vers le ligand alors que la glycine 303 pointe à l'opposé de la phénylalanine 302. Leur position suggère donc leur rôle potentiel majeur dans l'interaction de ligands spécifiques au niveau du site de liaison et dans le mécanisme d'activation du récepteur.

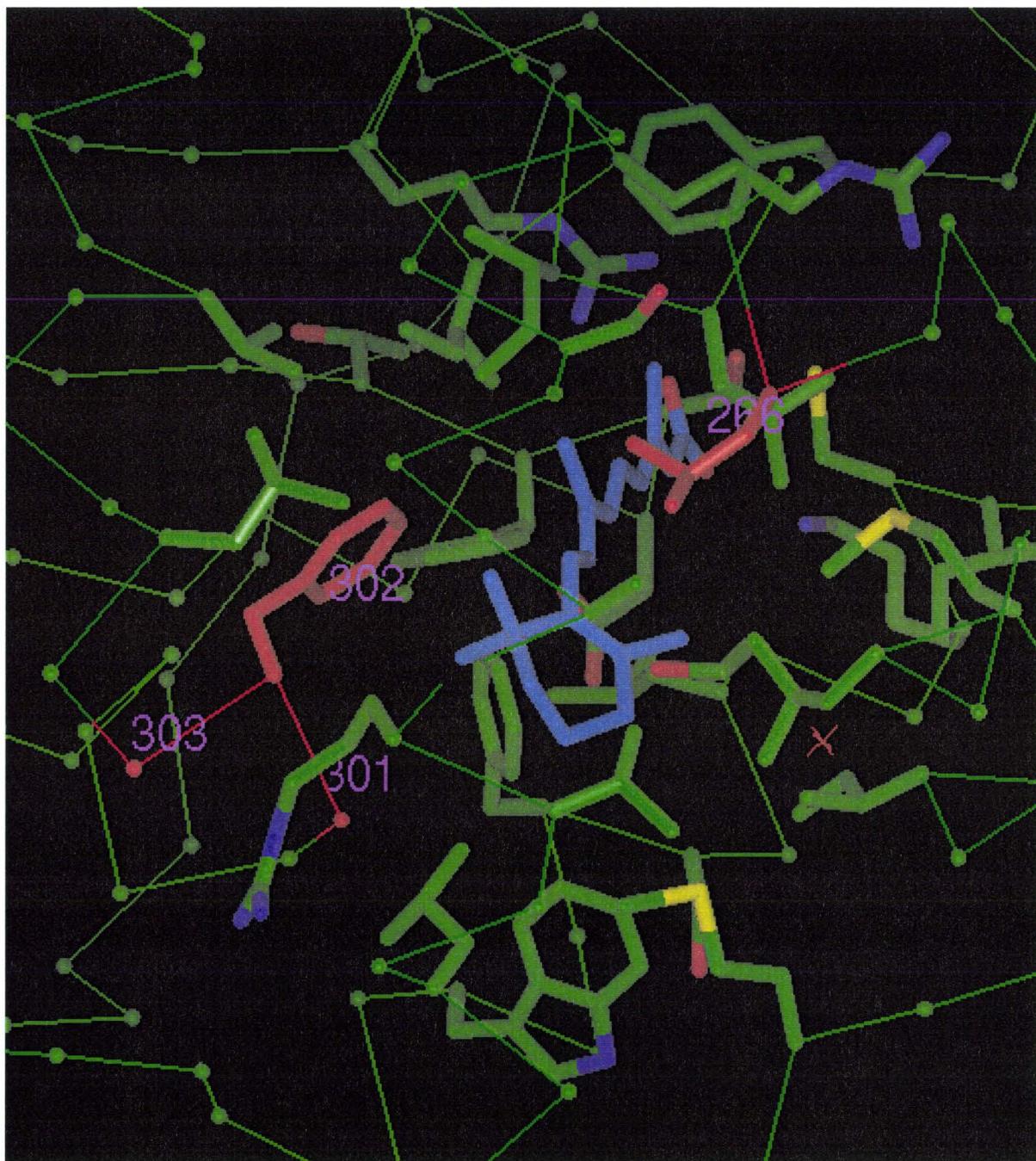


Fig. 47 : Gly 301, Phe 302, Gly 303 et Leu 266 dans le site de liaison au ligand de hRAR α (Modélisation CIRD Galderma)

Les chaînes latérales des acides aminés du site sont figurées (5Å)

Les sphères vertes représentent les C α des autres acides aminés

(Couleur des atomes : O : rouge

N : bleu

S : jaune)

Conclusion

et

perspectives

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'implication de résidus d'acides aminés déterminants pour l'interaction RAR α -ligand. La première partie concernant l'étude des résidus de tyrosine du domaine E de RAR α est particulièrement intéressante de par sa triple approche. Tout d'abord, une approche biochimique indirecte par les expériences d'inactivation chimique. Puis une seconde approche indirecte, physicochimique, par la spectrométrie de masse et enfin une approche plus classique par la mutagenèse dirigée. De cette façon, nous avons identifié la tyrosine 277 comme étant un résidu déterminant dans l'activation de RAR α . Cependant, contre toute attente, en modélisation moléculaire ce résidu n'est pas orienté vers *t*-RA. Ce résidu n'interagit donc pas avec le ligand mais impose une conformation telle en présence du ligand, qu'il est indispensable à l'activation du récepteur. Nous pouvons tout de même nous demander si ce résidu d'acide aminé est également un résidu important pour RAR β et RAR γ . Nous avons aussi observé que le mutant Y362A possédait une bonne affinité pour *t*-RA mais ne transactivait que faiblement. La tyrosine 362 ne se situe pas dans l'AF-2 qui est la région déterminante pour l'activation des RARs. Cependant, dans le modèle moléculaire du LBD-hRAR γ , elle est située à la surface du domaine de liaison au ligand et pourrait interagir avec certains cofacteurs. Il serait donc intéressant d'identifier quel est ou sont ce(s) cofacteur(s). Dans la séquence de RAR γ , en position 374, se situe un 4^{ème} résidu de tyrosine non conservé parmi les RARs. Cet acide aminé pourrait également jouer un rôle dans l'activation ligand-dépendante du récepteur et dans les interactions protéine-protéine.

Dans la seconde partie du travail, nous nous sommes intéressés à la topographie de la LBP en fonction d'un ligand donné. Cette étude de relation structure-activité, nous a permis de mettre en évidence que selon la rigidité et l'encombrement de la structure du ligand utilisé, la réponse des mutants n'était pas toujours identique. Nous avons également confirmé le rôle de la région H6-H7 dans le changement de conformation entre l'apo- et l'holo-LBD. C'est un mécanisme dynamique qui devra être approfondi. En effet, il est actuellement encore difficile de comprendre les modifications fines obtenues par l'entrée du ligand. Nous pouvons cependant relever que la leucine 266 doit jouer un rôle particulier dans le mécanisme induit par les antagonistes.

Le rôle de ces différents résidus d'acides aminés au sein de la cavité de liaison des RARs dépend de la structure chimique du ligand qui confère alors une adaptation conformationnelle à la poche de liaison et devient alors responsable du mécanisme

d'activation agoniste ou antagoniste du récepteur. Les résidus identifiés de cette manière complètent la cartographie du site de liaison au ligand de cette famille des récepteurs nucléaires et peut servir de modèle de base pour l'identification de nouveaux rétinoïdes avec une activité biologique donnée. De plus, la compréhension des mécanismes d'activation par les antagonistes permettraient la synthèse de nouveaux rétinoïdes pouvant limiter les effets toxiques des composés classiquement employés.

Appendice

technique

Souches bactériennes

- M15 d'*Escherichia coli* ou SG13009 contenant le plasmide Rep 4 qui est porteur d'un gène de résistance à la kanamycine et qui exprime le répresseur Lac.
- JM109 d'*Escherichia coli* (Proméga)
- GM2163, souche dam^- (l'ADN n'est pas méthylé)
- *Epicurian coli* XL-1 Blue

Plasmides

- pQE9-LBDhRAR α
- pQE9-hRAR α (et pQE9-hRAR γ) contient l'ADN complémentaire du hRAR α (ou du hRAR γ) inséré dans le vecteur pQE9 (Diagen). (Le vecteur pQE9 permet d'exprimer toute protéine sous forme fusionnée avec six histidines).
- pSG5-hRAR α et pSG5-hRAR γ (P. Chambon)

A) BIOCHIMIE

*** Culture bactérienne et extraction protéique**

Les bactéries M15 contenant le vecteur pQE9-hRAR α sont précultivées dans 10 ml de milieu LB en présence d'ampicilline (100 $\mu\text{g/ml}$) et de kanamycine (60 $\mu\text{g/ml}$) à 37°C. Lorsque la D.O. à 580 nm atteint 0,2, la préculture est diluée dans 500 ml de milieu LB contenant les antibiotiques et la culture est mise en agitation à 37°C. Dès que la D.O.₅₈₀ est comprise entre 0,5 et 0,6, l'induction est déclenchée par addition d'Isopropyl- β -Thio Galactoside (IPTG à 0,5 mM de concentration finale). La culture se poursuit pendant 3 heures puis elle est centrifugée 10 minutes à 6000 rpm. Le culot est repris par 6 ml de tampon : Tris 50 mM pH8,0, EDTA 1 mM, KCl 100 mM et 2 mg de lysozyme sont ajoutés. Après 30 minutes dans la glace, l'extrait est soniqué 2 fois 30 secondes avec addition entre les deux sonications de 6 ml de tampon. Enfin l'extrait est centrifugé 45 minutes à 15000 rpm à 4°C. Le surnageant est alors conservé à -20°C en présence de 10% de glycérol.

*** Modification chimique des récepteurs par le TNM**

Pour diluer l'extrait bactérien, un tampon Tris 20 mM pH9,0 est utilisé et le TNM est préparé en solution 10 mM et 100 mM dans l'éthanol absolu. Les concentrations finales en TNM utilisées sont comprises entre 0,2 μM et 200 μM . La réaction se poursuit pendant 2 heures à 4°C avant d'être bloquée par l'ajout d'une quantité stoechiométrique de DTT.

***Expression et purification par chromatographie d'affinité du LBD-hRAR α**

Tampons :

Tampon A : Chlorhydrate de guanidine 6 M

NaH₂PO₄ 0,1 M

Tris 0,01M, pH8,0

β -Mercaptoéthanol 0,02 M

Tampons B à E : Urée 8 M

NaH₂PO₄ 0,1 M

Tris 0,01 M

β -Mercaptoéthanol 0,02 M

Tampon B : pH8,0

C : pH6,3

D : pH5,9

E : pH4,5

Tampon F : Chlorhydrate de guanidine 6 M

Acide acétique 0,2 M

Expression de la protéine Δ N186-462 et traitement au tétranitrométhane

Les bactéries M15 exprimant la protéine recombinante Δ N186-462 sont cultivées en présence de 10⁻⁶ M d'acide *tout trans* rétinolique, et induites comme il a été décrit précédemment. La culture est centrifugée 30 minutes à 4000 rpm à 4°C. Le culot est repris par 1 ml de tampon Tris 0,02 M pH8,0 et il est soniqué 3 fois 1 minute. Puis, de nouveau, 10⁻⁶ M d'acide *tout trans* rétinolique (dilué dans le DMSO) sont ajoutés et le tout est laissé dans la glace pendant 1 heure à l'obscurité. Les protéines sont alors nitrosylées avec 5 mM en concentration finale de tétranitrométhane pendant 5 heures à 0°C. La réaction est arrêtée par ajout de DTT (5 mM de concentration finale). Après 1 heure d'incubation en présence de 5 ml de tampon A à température ambiante, l'extrait est centrifugé 40 minutes à 15000 rpm.

Purification de la protéine

La protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA (Quiagen). La résine (1 ml) est lavée avec de l'eau puis successivement par 10 ml de tampon A, 4 ml de B, 8 ml de C, 3 ml de F et 4 ml de A. Le surnageant est ensuite déposé sur la

colonne (débit de 0,1 ml/min) puis la résine est lavée par 10 ml de tampon A, 5 ml de B, 6 ml de C et 10 ml de D. L'élution est effectuée par 5 ml de tampon E.

***Dosage des protéines**

Il est réalisé selon la méthode de Bradford et grâce au kit de dosage des protéines (Biorad). 10 μ l d'extrait sont dilués dans 790 μ l d'eau et 200 μ l de solution de dosage (bleu de coomassie, méthanol, acide phosphorique). Le lysozyme est utilisé pour la gamme étalon et la mesure de la D.O. s'effectue à 595 nm.

***Hydrolyse chimique et enzymatique du RAR α**

Par l'acide acétique : la protéine recombinante purifiée (10nmoles/ml), dialysée contre HCl 0.01N et lyophilisée, est hydrolysée par l'acide acétique 0,25N à 105°C pendant 24h. L'acide acétique coupe en C- et N-terminal des résidus d'acide aspartique et parfois des résidus d'asparagine. L'hydrolyse est arrêtée par dilution suivie d'une lyophilisation.

Par l'endoprotéase Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8) : rapport 1/50 (p/p) dans un tampon d'acétate d'ammonium 50mM, pH4,0 pour une coupure plus spécifique après les résidus d'acide glutamique, pendant 16h à 37°C.

***Analyse par spectrométrie de masse**

L'analyse est réalisée grâce au couplage du spectromètre de masse en mode électrospray avec la chromatographie liquide haute performance. Le double hydrolysats est repris dans 1,5 ml d'acide acétique à 10%. 12 nmoles (200 μ l) sont injectés en HPLC sur une colonne C4 Browlee 5 μ (100x2,1mm) avec un gradient de 10 à 100% d'acétonitrile et un débit de 200 μ l/minute. Les peptides élués de la colonne sont analysés en continu dans un spectromètre API-1 Perkin Elmer Sciex simple quadrupole équipé d'une source ionspray (Sciex, Toronto, Canada). Le quadrupole est calibré par le polypropylène glycol. Un potentiel de +5,5 kV est appliqué à l'extrémité de l'aiguille d'injection. Un voltage de +90V est appliqué à l'orifice. L'acquisition des spectres est réalisée entre 400 et 2400 uma avec un pas de 0,2 Da et un "dwell time" de 0,5 ms. Le programme Mac Bio Spec est utilisé pour calculer les masses moléculaires des échantillons.

***Mesure de l'activité de liaison des récepteurs par la technique d'adsorption au charbon-dextran**

Après dilution convenable dans le tampon d'extraction (Tris, KCl, EDTA), les extraits (250 µl) sont incubés en présence de [11, 12 ³H]t-RA (55,6 Ci/mmol; NEM) ou de CD367 tritié (52,8 Ci/mmol; CIRD Galderma-Sophia Antipolis) pendant 16 heures à 4°C. La liaison non spécifique est mesurée par incubation en parallèle des mêmes échantillons en présence d'un excès de 200 fois du ligand non radioactif, et soustraite de l'activité de liaison spécifique. Lors des études de compétition de ligands, la concentration en CD367 tritié reste constante (10 nM) alors que les concentrations en ligand compétiteurs sont croissantes. L'activité de liaison est mesurée par la technique au charbon-dextran (Sablonnière B. et *al.*, 1994). 200 µl des incubats sont ajoutés à 100 µl de suspension de charbon. Après homogénéisation et incubation pendant 15 minutes à 4°C, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 4000 rpm. 150 µl de surnageant sont prélevés et mélangés à 2 ml de liquide de scintillation afin de mesurer la radioactivité. Le KI est déterminé à partir de la formule :

$$K_i = IC_{50} [1 + [t\text{-RA}^*] / K_d]^{-1}.$$

IC₅₀ correspondant à la concentration en compétiteur pour inhiber 50% de la liaison de t-RA.

***Electrophorèse**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée selon la technique de Laemmli. Après dépôt des échantillons dénaturés 5 minutes à 100°C en présence de tampon dénaturant 6X (Tris 0,3 M, SDS 8%, Glycérol 30%, β-Mercaptoéthanol 0,8 M, Bleu de Bromophénol 0,8%) sur un gel d'acrylamide à 10% (avec un rapport acrylamide/bis acrylamide de 29:1), la migration s'effectue sous courant constant de 30 mM.

***Western blot**

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10%, le transfert est réalisé pendant 12 heures à 25 V dans un tampon Tris 20 mM pH8.3, Glycine 150 mM, Méthanol 20%, sur membrane de nitrocellulose orientée vers l'électrode positive. Pour vérifier l'efficacité du transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau (2% de rouge Ponceau, 3% d'acide trichloroacétique) puis saturée dans du TBS 1X, Tween 20 1/1000 et 5% de lait écrémé pendant 45 minutes à 37 °C. Après plusieurs lavages dans le TBS-Tween, le premier anticorps spécifique de RARα (anti-lapin RARα,1/500) est incubé pendant 2 heures à température ambiante dans le TBS-Tween avec 1% de lait. Puis la membrane de nouveau lavée, le second anticorps (anti-anti-lapin marqué à la peroxydase) est ajouté dans une

proportion de 1/1000. La révélation de la membrane se réalise par chimioluminescence grâce au kit ECL (Amersham).

B) BIOLOGIE MOLECULAIRE

***Préparations plasmidiques**

Minipréparation

Les préparations en petites quantités de plasmides s'effectuent selon le protocole Proméga (kit Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System)

Maxipréparation

Solutions :

Solution de resuspension : Glucose 50 mM

Tris-HCl 25 mM pH7,5

EDTA 10 mM

Solution de lyse : NaOH 200 mM

SDS 1%

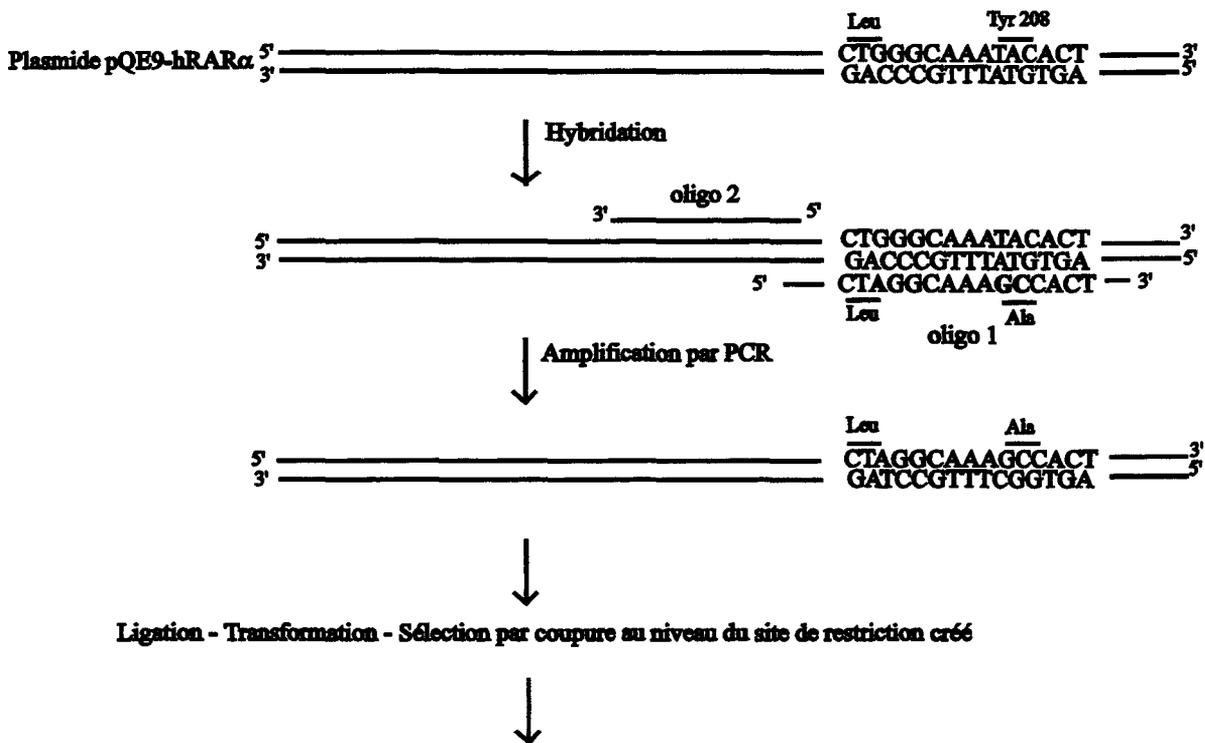
Solution de neutralisation : Acétate de potassium 1,32 M pH4,8

Acide acétique 11,5%

La culture de bactéries s'effectue sous agitation pendant 16 heures à 37°C dans 500 ml de milieu LB avec antibiotique. Elle est ensuite centrifugée 10 minutes à 4000 rpm à 4°C. Le culot est repris par 15 ml de solution de resuspension puis 15 ml de solution de lyse et 15 ml de solution de neutralisation. Après centrifugation pendant 15 minutes à 4000 rpm à 4°C, le surnageant est filtré, 0,6 volume d'isopropanol est ajouté et le tout est centrifugé 15 minutes à 8000 rpm à 4°C. Le culot est repris par 2 ml de tampon TE et 40 µg/ml de RNase pendant 30 minutes à 37°C. Un volume de PEG 8000 (13%)/NaCl 1,6 M est alors additionné et la préparation est centrifugée 5 minutes à 12000 g. Le culot est repris par 500 µl d'eau et une extraction phénol-chloroforme-alcool isoamylique est réalisée. L'ADN de la phase aqueuse est précipité 10 minutes à température ambiante dans 0,25 volume d'acétate d'ammonium 10N et 2 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation de 20 minutes à 15000 rpm à 4°C et 2 lavages à l'éthanol 70%, le culot est séché et repris dans de l'eau.

*Mutagenèse dirigée

Principe



Comme le plasmide entier a été amplifié, des mutations non spécifiques ont pu se former donc échange de la cassette SacI-BCII contenant la mutation avec le plasmide sauvage, puis séquençage

Les mutants sont obtenus par PCR et selon le protocole du kit Stratagène (ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis)

Oligonucléotides utilisés

Pour le mutant hRARα-Y208A (mutation silencieuse pour obtenir le site de restriction de BfaI) :

5'-CTC-TGC-CAG-CTA-GGC-AAA-GCC-ACT-ACG-AAC-AAC-AG-3'

5'-GGC-AGG-GAA-GGT-TTC-CTG-GTG-CGC-TTT-GCG-CAC-3'

Pour le mutant hRARα-Y277A (mutation silencieuse pour obtenir le site de restriction de EcoRV) :

5'-CTG-GAT-ATC-CTG-ATC-CTG-CGG-ATC-TGC-ACG-CGG-GCC-A-3'

5'-GCA-GGC-AGC-CTT-GAG-GAG-GGT-GAT-CTG-GTC-GG-3'

Pour le mutant hRARα-Y277F (mutation silencieuse pour obtenir le site de restriction de EcoRV) :

5'-CTG-GAT-ATC-CTG-ATC-CTG-CGG-ATC-TGC-ACG-CGG-TTC-ACG-3'

5'-GAC-GCA-GGC-AGC-CTT-GAG-GAG-GGT-GAT-CTG-GTC-3'

Pour le mutant hRAR α -Y362A (mutation silencieuse pour obtenir le site de restriction XhoI) :

5'-CCG-CTG-CTC-GAG-GCG-CTA-AAG-GTC-GCC-GTG-CG-3'

5'-CTC-CTG-CAG-CAT-GTC-CAC-CCG-GTC-CGG-CTG-CTC-C-3'

Pour le mutant hRAR α -G301A, -F302A et -G303A (mutation silencieuse pour obtenir le site de restriction de NsiI) :

5'-ATG-CAT-AAC-GCT-GCC-TTC-GGC-CCC-C-3'

5'-ATG-CAT-AAC-GCT-GGC-GCC-GGC-CCC-C-3'

5'-ATG-CAT-AAC-GCT-GGC-TTC-GCC-CCC-C-3'

5'-CTG-GGT-CCG-GTT-CAG-GGT-CAG-3'

Pour le mutant hRAR α -L266A (mutation silencieuse pour obtenir un site de restriction de EcoRV) :

5'-C-AAG-GCT-GCC-TGC-GCG-GAT-ATC-C-3'

5'-AGG-AGG-GTG-ATC-TGG-TCG-GCG-3'

Pour le mutant hRAR α -L398A (mutation silencieuse pour obtenir un site de restriction de BclI) :

5'-CGG-GTA-ATC-ACG-GCG-AAG-ATG-GAG-ATC-CCG-GGC-3'

5'-CTC-AGC-CCC-CTT-GGC-GCT-GAT-GCT-TCG-CAG-GTC-3'

Phosphorylation des oligonucléotides

20 μ g d'oligonucléotide antisens sont phosphorylés 30 minutes à 37°C dans 4 μ l de tampon 10X (Tris-HCl 0,7 M pH7,6; MgCl₂ 0,1M, DTT 0,05 M) en présence de 1 μ l de T₄ polynucléotide kinase et 1 mM d'ATP dans un volume final de 40 μ l.

PCR

0,5 pmoles d'ADN sont mis en présence de 2,5 μ l de tampon 10X (Tris-HCl 0,2 M, pH8,3; KCl 0,1 M, (NH₄)₂SO₄ 0,1 M, MgSO₄ 0,02 M, Triton X-100 1% (v/v), sérum albumine bovine 1 mg/ml), 1 mM de dNTPs et 15 pmoles de chaque oligonucléotide (qsp 24 μ l avec de l'eau). L'ADN est dénaturé 5 minute à 94°C puis 0,5 μ l de Taq DNA Polymérase (5U/ μ l) et 0,5 μ l de Taq Extender (5U/ μ l) sont ajoutés. La PCR comprend 11 cycles de dénaturation à 94°C, d'hybridation entre 58 et 62°C (2 minutes) et d'élongation à 72°C (5 minutes).

Formation des bouts francs

Avant d'effectuer la ligation, les bouts francs sont formés en incubant le produit de PCR 30 minutes à 37°C avec 1 µl d'enzyme de restriction DpnI (10U/µl) et 0,5 µl de l'enzyme Cloned Pfu DNA Polymérase (2,5 U/µl), puis 30 minutes à 72°C afin d'inactiver l'enzyme. Ensuite 100 µl d'eau sont ajoutés ainsi que 10 µl de tampon 10X et 5 µl de rATP 10 mM.

Gel d'agarose

Les produits de PCR (10 µl) sont déposés en gel agarose 0,8% dans un tampon TBE 0,5X pour vérifier la taille de l'ADN amplifié.

Ligation

10 µl d'échantillon sont mélangés avec 1 µl de T4 DNA ligase (4U/µl) pendant 1 heure à 37°C.

Transformation

Elle se fait avec 80 µl d'*Epicurian coli* XL-1 Blue supercompétentes et 1 µg de plasmide. Les bactéries sont incubées 30 minutes dans la glace puis 45 secondes à 42°C et 2 minutes à 4°C. 800 µl de SOC sont alors ajoutés et les bactéries sont laissées 1 heure à 37°C puis étaler sur boîte de Pétri contenant du LB Agar additionné de 100 µg/ml d'ampicilline. (Les transformations dans d'autres souches bactériennes telles que les JM109 ou les M15 s'effectuent selon le même protocole mais seulement 20 µl de bactéries compétentes sont utilisées).

Hydrolyse par enzyme de restriction

Après transformation, des clones sont repris dans 10 ml de milieu LB avec de l'ampicilline puis une mini-préparation plasmidique est réalisée. Ensuite une digestion enzymatique est effectuée au moins pendant 2 heures et selon les conditions prévues de l'enzyme (température et U/µg de plasmide) afin d'identifier des clones potentiellement positifs grâce au site de restriction introduit par mutation silencieuse.

***Extraction de fragments sur gel d'agarose**

Protocole selon le kit " Agarose Gel DNA Extraction " de chez Boehringer Mannheim à partir d'un gel d'agarose 1% en TAE 1X.

***Séquençage**

Utilisation du kit Amersham

- Dénaturation

5 µg de plasmide (qsp 12 µl avec de l'eau), 4 µl d'EDTA 1 mM et 4 µl de NaOH 1M sont placés 30 minutes à 37°C, puis neutralisés par 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH5,5). L'ADN est ensuite précipité dans 100 µl d'éthanol 100% pendant au moins 1 heure à -20°C et après 30 minutes de centrifugation à 12000 g à 4°C et 2 lavages à l'éthanol 70%, le culot est séché.

- Radiomarquage

Le culot est repris par 6 µl d'eau et 2µl de tampon de réaction de la sequenase ainsi que 2 µl d'oligonucléotide (à 0,5 pmoles/µl) sont ajoutés et laissés 30 minutes à 37°C.

- Extension

Les bases (2,5 µl) sont réparties dans chaque puits sur une microplaque. Deux mélanges réactionnels sont ensuite préparés. Tout d'abord, le mélange de marquage : (pour 4 séquences) 1,7 µl du mélange de marquage et 6,7 µl d'eau, puis la dilution de la séquenase : 1 µl de sequenase et 7 µl de tampon de dilution de l'enzyme. Ensuite 4 µl de DTT 0,1 M, 8 µl du mélange dilué de marquage et 2 µl de [³⁵S]dATP sont ajoutés à la sequenase diluée. Toutes les 40 secondes, 5,5 µl de ce mélange sont répartis dans chacun des ADN primés. L'extension s'effectue pendant 5 minutes à température ambiante.

- Terminaison

Dans chaque puits, 3,5 µl des ADNs sont ajoutés toutes les 10 secondes et laissés pendant 7 minutes à 37°C. Pour arrêter la réaction 4 µl de solution stop sont placés dans chaque puits toutes les 10 secondes.

Gel de séquence

Gel à 6% d'acrylamide (30 ml de Séquagel-6 Ultra pure avec 12 ml de Séquagel complet et 300 µl de persulfate à 10%). Avant de déposer les échantillons, il faut les dénaturer 3 minutes à 80°C puis les placer sur la glace. La migration se fait dans le tampon TBE 1X à 80W, puis le gel est séché et mis en autoradiographie à -80°C.

***Transcription/traduction des protéines *in vitro* et protéolyse limitée**

Transcription/traduction

La synthèse *in vitro* de récepteurs radiomarqués s'effectue suivant le protocole " TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems " (Promega) qui permet de coupler la transcription et la traduction. A 12,5 µl de lysat de réticulocytes de lapin sont ajoutés 1 µl de tampon TNT, 0,5 µl de T7 ARN polymérase, 0,5 µl d'acides aminés sans méthionine, 2 µl de [³⁵S]-méthionine et 1 µg de plasmide pSG5-hRARα (récepteur sauvage ou muté). Le mélange est complété à 25 µl avec de l'eau et incubé 1 heure 30 minutes à 30°C.

Protéolyse limitée

Les échantillons de lysat de réticulocytes après traduction sont mis en présence de ligand (10⁻⁶ M) pendant 20 minutes à température ambiante. Puis selon le type d'hydrolyse enzymatique, ils sont incubés avec 50mg/ml de trypsine pendant 30 min. à température ambiante ou avec 50mg/ml de chymotrypsine, 30 min à 37°C ou avec 100mg/ml l'endoprotéinase Arg-C ou Lys-C pendant 1 heure à 37°C.

Les échantillons sont ensuite déposés en gel SDS-Page à 12% d'acrylamide. Après migration à 30 mA, le gel est fixé avec une solution méthanol (600ml), acide acétique (160ml), eau (qsp 2 litres) pendant 30 minutes puis coloré 45 minutes dans du colorant Page-SDS (Bleu de Coomassie R250 0,1%, Méthanol 25%, Acide trichloroacétique 12,5%) et décoloré dans une solution de Méthanol à 30% et d'acide acétique à 6%. Le gel est ensuite laissé 30 minutes dans "l'amplify" (Amersham) avant d'être séché et mis en autoradiographie pendant 1 à 2 nuits à -80°C.

***Radiomarquage de l'oligonucléotide βRARE**

2 µM d'oligonucléotides complémentaires simple brin sont hybridés pendant 10 minutes à 90°C dans un tampon Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH8.0, puis refroidis à température ambiante. Ensuite 4 pmoles d'oligonucléotides double brin (2µl) sont mélangés à 6 pmoles de γ[³²P]ATP (3 µl), 2 µl de tampon 10X, 2 µl de T4-Polynucléotide Kinase (20U) qsp 20 µl avec de l'eau et incubés 30 minutes à 37°C. L'ADN radiomarqué est alors dessalé sur colonne Chromaspin-10 : après centrifugation 2 minutes à 700 g de la colonne vide, la solution radioactive, ajustée à 40 µl avec de l'eau, est déposée sur la colonne et centrifugée 6 minutes à 700 g. La solution collectée est ajustée à 150 µl final.

***Gel retard**

2 μ l de lysat de réticulocytes exprimant RAR α sauvage ou muté et 2 μ l d'extrait exprimant RXR α sont incubés en présence de 2 μ l de tampon Hépes 200 mM pH7,4, KCl 1500 mM, EDTA 10 mM, Glycérol 40%, de 0,05 μ g d'ADN de sperme de saumon, qsp 19 μ l avec de l'eau pendant 20 minutes à 4°C. Puis la sonde d'ADN β RARE radiomarquée (1 μ l) est ajoutée ainsi que 1 μ l de sonde froide dans le cas d'une caractérisation du complexe et le tout est laissé 15 minutes dans la glace. Pour le "supershift", 1 μ l d'anticorps spécifique des RARs ou des RXRs est additionné pendant 2 heures dans la glace.

Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide à 5% en tampon TAE 0,5X non dénaturant pour séparer les complexes récepteurs liés à l'ADN de l'ADN libre. La migration de l'électrophorèse s'effectue à 150 V pendant 2 à 3 heures. Le gel est ensuite séché sous-vide puis placé en autoradiographie contre un film X-Omat à -80°C pendant une nuit.

C) BIOLOGIE CELLULAIRE

***Culture cellulaire et transfection**

Les transfections sont réalisées dans les cellules COS 7 de rein de singe transformées par SV40. Les cellules COS 7 sont cultivées en milieu DMEM (Dubbelco's Eagles) additionné de 10% de sérum de veau foetal et de 1% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) sur boîte de 500 ml incubée préalablement avec de la gélatine (1%). Après trypsinisation, 250000 cellules sont réparties par puits de 60 mm de diamètre. Le jour suivant, les cellules sont cotransfectées par 1 μ g final d'ADN comprenant 30 ng de plasmide pSG5-hRAR α sauvage ou muté, 30 ng de plasmide pSG5-hRXR α , 300 ng de plasmide contenant l'élément de réponse TRE-pal luciférase et 100 ng de plasmide exprimant la β -galactosidase. La cotransfection s'effectue grâce à 4 μ l par puits de PolyÉthylène Imine (PEI, ExGen 500, Euromédex). 24 heures plus tard, les cellules, en milieu DMEM avec 2,5% de sérum de veau foetal, sont incubées avec le ligand dilué dans l'éthanol. Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS et peuvent être lysées afin de déterminer leur activité de transactivation par rapport aux gènes reporters de la luciférase et de la β -galactosidase.

***Mesure de l'activité transactivatrice**

Tampons :

Tampon de lyse : Triton X-100 1%

Glygly 25 mM

MgSO₄ 15 mM

EGTA 4 mM pH7,4

DTT 1 mM

Tampon luciférase : Glygly 25 mM

KH₂PO₄ 15 mM

MgSO₄ 15 mM

EGTA 4 mM pH7,4

ATP 2 mM

DTT 1 mM

Tampon solution stock luciférine : D-Luciférine 1 mM

Glygly 25 mM

DTT 10 mM qsp 16 ml avec de l'eau

(Aliquotes de 2 ml stockées à -80°C et à diluer dans 8 ml de tampon Glygly 25mM)

Tampon ONPG : Na₂HPO₄ 60 mM

NaH₂PO₄ 40 mM

KCl 10 mM

β-Mercaptoéthanol 50 mM

Dosage de l'activité transactivatrice

Les cellules sont lysées avec 200 µl de solution de lyse. 100 µl sont mélangés à 400 µl de tampon luciférase et l'activité luciférase est dosée grâce au luminomètre. En parallèle, l'activité β-Galactosidase est déterminée en tant que contrôle de la transfection. 50 µl de cellules lysées sont mélangées à 58 µl de tampon ONPG et 15 µL de O-NitroPhényl Galactosidase (4 mg/ml d'ONPG repris dans une solution Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM) puis le tout est laissé à 37°C. Lorsque les échantillons deviennent jaunes, la réaction est arrêtées par 60 µl de Na₂CO₃ 1 M et les extraits sont dosés à 420 nm.

D) PRINCIPAUX TAMPONS ET MILIEUX UTILISES

TBE 10X : Tris 0,09 M pH8,0

Acide borique 0,9M

EDTA 20 mM

TAE 10X : Tris/Acide acétique 0,4 M pH8,0

EDTA 0,01 M

PBS : NaCl 138mM

KCl 2,7mM

Na₂HPO₄, 12H₂O 4 mM

KH₂PO₄ 1,8mM pH7,4

TBS : Tris 10 mM

NaCl 150 mM pH7,4

TE : Tris 10 mM

EDTA 1 mM pH7,5

Tampon de migration d'électrophorèse : Tris 25 mM

Glycine 200 mM

SDS 0,1%

Milieu Luria-Bertoni : Extrait de levure 5 g

Bactotryptone 10 g

NaCl 10 g pH7,3 qsp 1 l

SOC : Bactotryptone 20g

Extrait de levure 5g

NaCl 0,5g

KCl 2,5 mM qsp 1 l pH7,0

MgCl₂ 10 mM

Glucose 20 mM

Colorant Page SDS : Bleu de Coomassie R250 : 1 g

Méthanol 250 ml

ATCA 50% : 250 ml qsp 500 ml avec de l'eau

Bibliographie

- ABU-ABED, S.S., BECKETT, B.R., CHIBA, H., CHITHALEN, J.V., JONES, G., METZGER, D., CHAMBON, P. & PETKOVICH, M. (1998) Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 2409-2415.
- ALLAN, G.F., LENG, X., TSAI, S.Y., WEIGEL, N.L., EDWARDS, D.P., TSAI, M. & O'MALLEY, B.W. (1992) Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 19513-19520.
- AMERO, S.A., KRETSINGER, R.H., MONCRIEF, N.D., YAMAMOTO, K.R. & PEARSON, W.R. (1992) The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 3-7.
- APFEL, C., BAUER, F., CRETAAZ, M., FORNI, L., KAMBER, M., KAUFMANN, F., LEMOTTE, P., PIRSON, W. & KLAUS, M. (1992) A retinoic acid receptor α antagonist selectivity counteracts retinoic acid effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7129-7133.
- APFEL, C.M., KAMBER, M., KLAUS, M., MOHR, P., KEIDEL, S. & LEMOTTE, P.K. (1995) Enhancement of HL-60 differentiation by a new class of retinoids with selective activity on retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 30765-30772.
- AZIM, E., AUZELOUX, P., MAURIZIS, J.C., BRAESCO, V., GROLIER, P., VEYRE, A. & MADELMONT, J.C. (1995) Synthesis of all-*trans*-beta-carotene retinoids and derivatives labelled with ^{14}C . *J. Labelled Compounds and Radiopharm.* **38**, 441-451.
- BAILLY, J., DELESCLUSE, C., BERNARDON, J.M., CHARPENTIER, B., MARTIN, B., PILGRIM, W.R., SHROOT, B. & DARMON, M. (1990) Differentiation of F9 embryonal carcinoma cells by synthetic retinoids: amplitude of plasminogen activator production does not depend on retinoid potency or affinity for F9 nuclear retinoic acid receptors. *Skin Pharmacol.* **3**, 256-267.
- BARGER, P.M. & KELLY, D.P. (1997) Identification of a retinoid/chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor response element in the human retinoid X receptor gamma2 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 2722-2728.
- BAVIK, C.O., BUSCH, C. & ERIKSSON, U. (1992) Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* **267**, 23035-23042.
- BEARD, R.L., GIL, D.W., MARLER, D.K., HENRY, E., COLON, D.F., GILLETT, S.J., AREFIED, T., BREEN, T.S., KRAUSS, H., DAVIES, P.J.A. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 1447
- BEARD, R.L., CHANDRARATNA, R.A.S., COLON, D.F., GILLETT, S.J., HENRY, E., MARLER, D.K., SONG, T., DENYS, L., GARST, M.E. & AREFIEG, T. (1995a) Synthesis and structure-activity relationships of stilbene retinoid analogs substituted with heteroaromatic carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **38**, 2820-2829.
- BEARD, R.L., COLON, D.F., KLEIN, E.S., VORSE, K.A. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1995b) Differential RXR and RAR activity of stilbene retinoid analogs bearing thiazole and imidazole carboxylic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2729-2734.
- BEARD, R.L., TENG, M., COLON, D.F., DUONG, T.T., THACHER, S.M., AREFIEG, T. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1997) Synthesis and biological activity of 1,2,3,4-tetrahydroquinoline and 3,4-(1H)-dihydroquinolin-2-one analogs of retinoic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2373-2378.

- BECKER, H.J. (1959) Die puffs der spiecedrusenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtung der verhalten des puffmusters in normalstamm und bei zwei mutanten, giant und lethal-giant-larvae. *Chromosoma*, **10**, 654-678.
- BENKOUSSA, M., NOMINÉ, B., MOUCHON, A., LEFEBVRE, B., BERNARDON, J.M., FORMSTECHEP, P. & LEFEBVRE, P. (1997) Limited proteolysis for assaying ligand binding affinities of nuclear receptors. *Receptors and signal transduction*, **7**.
- BENNER, S.E., LIPPMAN, S.M. & HONG, W.K. (1995) Current status of retinoid chemoprevention of lung cancer. *Oncology*, **9**, 205-210.
- BERNARD, B.A., BERNARDON, J., DELESCLUSE, C., MARTIN, B., LENOIR, M., MAIGNAN, J., CHARPENTIER, B., PILGRIM, W.R., REICHERT, U. & SHROOT, B. (1992) Identification of synthetic retinoids with selectivity for human nuclear retinoic acid receptor gamma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **186**, 977-983.
- BHAT, M.K., MCPHIE, P. & CHENG, S.Y. (1997) Critical role of glutamine 252 in the hormone-dependent transcriptional activity of the thyroid hormone beta 1 nuclear receptor. *Biochem.*, **36**, 4233-4239.
- BISCHOFF, E.D., GOTTARDIS, M.M., MOON, T.E., HEYMAN, R.A. & LAMPH, W.W. (1998) Beyond tamoxifen: The retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 (TARGRETIN) causes complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Res.* **58**, 479-484.
- BLANCO, J., WANG, I., TSAI, M., O'MALLEY, B.W., JURUTKA, P., HAUSSLER, M.R. & OZATO, K. (1995) Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1535-1539.
- BLOMHOFF, R., GREEN, M.H. & NORUM, K.R. (1992) Vitamin A : physiological and biochemical processing. *Annual Review of Nutrition*, **12**, 37-57.
- BOEHM, M.F., ZHANG, L., BADEA, B.A., WHITE, S.K., MAIS, D.E., BERGER, E., SUTO, C.M., GOLDMAN, M.E. & HEYMAN, R.A. (1994) Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *J. Med. Chem.* **37**, 2930-2941.
- BOEHM, M.F., ZHANG, L., ZHI, L., MC CLURG, M.R., BERGER, E., WAGONER, M., MAIS, D.E., SUTO, C.M., DAVIES, P.J.A., HEYMAN, R.A. & NADZAR, A.M. (1995) Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in Leukemia cells. *J. Med. Chem.* **38**, 3146-3155.
- BOERMAN, M. H. E. M. & NAPOLI, J. L. (1996) Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5610-5616.
- BOLLAG, W., RÜEGG, R. & RYSER, G. (1974) Polyene compounds. *German Patent*, **2**, 414-619.
- BOLLAG, W. (1996) The retinoid revolution. Overview. *FASEB J.* **10**, 938-939.
- BOTLING, J., CASTRO, D.S., OBERG, F., NILSSON, K. & PERLMANN, T. (1997) Retinoic acid receptor retinoid X receptor heterodimers can be activated through both subunits providing a basis for synergistic transactivation and cellular differentiation. *J. Biol. Chem.* **272**, 9443-9449.

- BOURGUET, W., RUFF, M., BONNIER, D., GRANGER, F., BOEGLIN, M., CHAMBON, P., MORAS, D. & GRONEMEYER, H. (1995a) Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor. *Protein Expr.Purif.* **6**, 604-608.
- BOURGUET, W., RUFF, M., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & MORAS, D. (1995b) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR α . *Nature*, **375**, 377-382.
- BOYLAN, J.F. & GUDAS, L.J. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-*trans*-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 21486-21491.
- BRAND, N., PETKOVICH, M., KRUST, A., CHAMBON, P., DE THÉ, H., MARCHIO, A., TIOLLAIS, P. & DEJEAN, A. (1988) Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, **332**, 850-853.
- BREITMAN, T.R., SELONICK, S.E. & COLLINS, S.J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2936-2940.
- BRZOZOWSKI, A.M., PIKE, A.C.W., DAUTER, Z., HUBBARD, R.E., BONN, T., ENGSTRÖM, O., OHMAN, L., GREENE, G.L., GUSTAFSSON, J. & CARLQUIST, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
- BURRIS, T.P., NAWAZ, Z., TSAI, M.J. & O'MALLEY, B.W. (1995) A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9525-9529.
- BYGDAMAN, M., SWAHN, M.L., GEMZELL-DANIELSSON, K. & SVALANDER, P. (1993) Mode of action of RU486. *Ann. Med.* **25**, 61-64.
- CAELLES, C., GONZALEZ-SANCHO, J.M. & MUNOZ, A. (1997) Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & Develop.* **11**, 3351-3364.
- CANAN KOCH, S.S., DARDASHTI, L.J., HEBERT, J.J., WHITE, S.K., CROSTON, G.E., FLATTEN, K.S., HEYMAN, R.A. & NADZAN, A.M. (1996) Identification of the first retinoid X receptor homodimer antagonist. *J. Med. Chem.* **39**, 3229-3234.
- CARLSTEDT-DUKE, J., STRÖMSTEDT, P., PERSSON, B., CEDERLUND, E., GUSTAFSSON, J. & JÖRNVALL, H. (1988) Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6842-6846.
- CARPENTIER, A., BALITRAND, N., ROCHETTE-EGLY, C., SHROOT, B., DEGOS, L. & CHOMIENNE, C. (1997) Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for functional receptor heterodimers. *Oncogene*, **15**, 1805-1813.
- CASTELBERRY, R.P., EMANUEL, P.D. & ZUCKERMAN, K.S. (1994) A pilot study of isotretinoin in the treatment of juvenile chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1680-1684.
- CAVAILLES, V., DAUVOIS, S., DANIELIAN, P.S. & PARKAR, M.G. (1994) Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10009-10011.
- CAVAILLES, V., DAUVOIS, S., L'HORSET, F., LOPEZ, G., HOARE, S., KUSHNER, P.J. & PARKER, M.G. (1995) Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **14**, 3741-3751.

- CHAMBON, P., ZELENT, A., PETKOVICH, M., MENDELSON, C., LEROY, P., KRUST, A. & KASTNER, P.B., N. (1991) In retinoids: 10 years. *On. J.H. Saurat,Ed*, 10-27.
- CHANDRARATNA, R.A.S. (1996) Tazarotene - first of a new generation of receptor-selective retinoids. *British J. Dermatol.*, **135**, 18-25.
- CHANDRARATNA, R.A.S. (1997) Tazarotene: The first receptor-selective topical retinoid for the treatment of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **37**, S12-S17.
- CHEN, J-Y., PENCO, S., OSTROWSKI, J., BALAGUER, P., PONS, M., STARRETT, J.E., RECZEK, P., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1995) RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.* **14**, 1187-1197.
- CHEN, J-Y., CLIFFORD, J., ZUSI, C., STARRETT, J., TORTOLANI, D., OSTROWSKI, J., RECZEK, P.R., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1996) Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature*, **382**, 819-822.
- CHEN, Z.P., IYER, J., BOURGUET, W., HELD, P., MIOSKOWSKI, C., LEBEAU, L., NOY, N., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1998) Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J. Mol. Biol.* **275**, 55-65.
- CHENG, L., NORRIS, A.W., TATE, B.F., ROSENBERGER, M., GRIPPO, J.F. & LI, E. (1994) Characterization of the ligand binding domain of human retinoid X receptor α expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 18662-18667.
- CHENG, S. Y., RANSOM, S.C., MCPHIE, P., BHAT, M.K., MIXSON, A.J. & WEINTRAUB, B.D. (1994) Analysis of the binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine and its analogues to mutant human β 1 thyroid hormone receptors: a model of the hormone binding site. *Biochem.* **33**, 4319-4326.
- CHIBA, H., MURAMATSU, M., NOMOTO, A. & KATO, H. (1994) Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1815-1820.
- CHIDIAC, P., HEBERT, T.E., VALIQUETTE, M., DENNIS, M. & BOUVIER, M. (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**, 490-499.
- CHOMIENNE, C., BALLERINI, P., BALITRAND, N., DANIEL, M.T., FENAUX, P., CASTAIGNE, S. & DEGOS, L. (1990) All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood*, **76**, 1710-1717.
- CLEVER, U. & KARLSON, P. (1960) Induktion von puff-veränderungen in den speicheldrusenchromosomen von chironomus tentans durch ecdyson. *Expl. Cell. Res.* **20**, 623-626.
- CLIFFORD, J., HIDEKI, C., SOBIESZCZUK, D., METZGER, D. & CHAMBON, P. (1996) RXR-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, antiproliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J.* **15**, 4142-4155.
- COSTA, T., OGINO, Y., MUNSON, P.J., ONARAN, H.O. & RODBARD, D. (1992) Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol. Pharmacol.* **41**, 549-560.

- CRAWFORD, M.J., LIVERSAGE, R.A. & VARMUZA, S.L. (1995) Two isoforms of *Xenopus* retinoic acid receptor gamma 2 (B) exhibit differential expression and sensitivity to retinoic acid during embryogenesis. *Dev. Genet.* **17**, 291-302.
- CRETIAZ, M., BAROJN, A., SIEGENTHALER, G. & HUNZIKER, W. (1990) Ligand specificities of recombinant retinoic acid receptors RAR α and RAR β . *Biochem. J.* **272**, 391-397.
- DALLERY, N., SABLONNIERE, B., GRILLIER, I., FORMSTECHEP, P. & DAUTREVAUX, M. (1993) Purification and functional characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor α : evidence that sulfhydryl groups are involved in ligand-receptor interactions. *Biochem.* **32**, 12428-12436.
- DAMM, D.S., THOMPSON, C.C. & EVANS, R.M. (1989) Protein encoded by v-erb A function as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature*, **339**, 593-597.
- DAWSON, M., CHAN, R.L.S., DERDZINSKI, K., HOBBS, P.D., CHAO, W. & SCHIFF, L.J. (1983) Synthesis and pharmacological activity of 6-[(E)-2-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)ethen-1-yl]- and -6-(1,2,3,4-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-6-naphthyl)-2-naphthalenecarboxylic acids. *J. Med. Chem.* **26**, 1653-1656.
- DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., CHAN, R.L., CHAO, W. & FUNG, V. (1981) Aromatic retinoic acid analogues. Synthesis and pharmacological activity. *J. Med. Chem.* **24**, 583-592.
- DAWSON, M.I., CHAO, W.R., HOBBS, P.D. & DELAIR, T. (1990) The inhibitory effects of retinoids on the induction of ornithine decarboxylase and the promotion of tumors in mouse epidermis. In "*Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*" (Dawson M.I. and Okamura W.H., eds), 385-466.
- DE LEAN, A., STADEL, J.M. & LEFKOWITZ, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7108-7117.
- DE THÉ, H., VIVANCO RUIZ, M.D.M., TIOLLAIS, P., STUNNENBERG, H. & DEJEAN, A. (1990) Identification of a retinoic acid response element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature*, **343**, 177-180.
- DE THÉ, H. & DEGOS, L. (1997) Retinoids/retinoic acid receptors in cancer. *Encyclopedia of Cancer*, **3**, 1561-1570.
- DEGOS, L., DOMBRET, H., CHOMIENNE, C., DANIEL, M.T., MICLÉA, J., CHASTANG, C., CASTAIGNE, S. & FENAUX, P. (1995) All-*trans*-retinoic acid as differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *J. Am. Soc. Hem.*, **85**, 2643-2653.
- DELESCLUSE, C., CAVEY, M.T., MARTIN, B., BERNARD, B.A., REICHERT, U., MAIGNAN, J., DARMON, M. & SHROOT, B. (1991) Selective high affinity retinoic acid receptor α or β - γ ligands. *Mol. Pharmacol.* **40**, 556-562.
- DÍAZ, P., MICHEL, S., STELLA, L. & CHARPENTIER, B. (1997) Synthesis and biological activities of new heterocyclic aromatic retinoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2289-2294.
- DOLLÉ, P., RUBERTE, E., KASTNER, P., PETKOVICH, M., STONER, C.M., GUDAS, L.J. & CHAMBON, P. (1989) Differential expression of genes encoding α , β and γ retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature*, **342**, 702-705.
- DON CHEN, J., UMESONO, K. & EVANS, R.M. (1993) SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7567-7571.

- DON CHEN, J. & EVANS, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457.
- DRISCOLL, J.E., SEACHORD, C.L., LUPISELLA, J.A., DARVEAU, R.P. & RECZEK, P.R. (1996) Ligand-induced conformational changes in the human retinoic acid receptor detected using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **271**, 22969-22975.
- DUESTER, G., SHEAN, M.L., MCBRIDE, M.S. & STEWARD, M.J. (1991) Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1638-1646.
- DUESTER, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochem.*, **35**, 12221-12227.
- DURAND, B., SAUNDERS, M., LEROY, P., LEID, M. & CHAMBON, P. (1992) All *trans* and 9 *cis* retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell*, **71**, 73-85.
- DURAND, B., SAUNDERS, M., GAUDON, C., ROY, B., LOSSON, R. & CHAMBON, P. (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-*cis* retinoid acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* **13**, 5370-5382.
- EKENA, K., WEIS, K.E., KATZENELLENBOGEN, J.A. & KATZENELLENBOGEN, B.S. (1997) Different residues of the human estrogen receptor are involved in the recognition of structurally diverse estrogens and antiestrogens. *J. Biol. Chem.* **272**, 5069-5075.
- ELMAZAR, M.M., REICHERT, U., SHROOT, B. & NAU, H. (1996) Pattern of retinoid-induced teratogenic effects: possible relationship with relative selectivity for nuclear retinoid receptors RAR alpha, RAR beta, and RAR gamma. *Teratology*, **53**, 158-167.
- ESGLEYES-RIBOT, T., CHANDRARATNA, R.A.S., LEW-KAYA, D.A., SEFTON, J. & DUVIC, M. (1994) Response of psoriasis to a new topical retinoid, AGN 190168. *J. Am. Acad. Dermatol.* **30**, 581-590.
- EVANS, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.
- FANJUL, A., DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., JONG, L., CAMERON, J.F., HARLEV, E., GRAUPNER, G., LU, X. & PFAHL, M. (1994) A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*, **372**, 107-111.
- FANJUL, A., BOUTERFA, H., DAWSON, M.I. & PFAHL, M. (1996) Potential role of retinoic acid receptor- γ in the inhibition of breast cancer cells by selective retinoids and interferons. *Cancer Res.*, **56**, 1571-1577.
- FIORELLA, P.D. & NAPOLI, J.L. (1991) Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 16572-16579.
- FISHER, G.J., ESMANN, J., GRIFFITHS, C.E.M., TALWAR, H.S., DWELL, E.A., HAMMERBERG, C., ELDER, J.T., KARABIN, G.D., NICKOLOFF, B.J., COOPER, K.D. & VOORHEES, J.J. (1991) Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid treated human skin. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 699-707.

- FOLKERS, G.E., VANDERLEEDE, B.M. & VANDERSAAG, P.T. (1993) The retinoic acid receptor-beta-2 contains 2 separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand binding domain. *Mol. Endocrinol.* **7**, 616-627.
- FORMAN, B.M. & SAMUELS, H.H. (1990) Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1293-1301.
- FORMAN, B.M., UMESONO, K., CHEN, J. & EVANS, R.M. (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, **81**, 541-550.
- FREEDMAN, L.P., LUISI, B.F., KORSZUN, Z.R., BASAVAPPA, R., SIGLER, P.B. & YAMAMOTO, K.R. (1988) The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, **334**, 543-546.
- GIANNINI, F., MAESTRO, R., VUKOSAVLJEVIC, T., POMPONI, F. & BOIOCCHI, M. (1997) All-trans, 13-cis and 9-cis retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines: implications for *in vivo* retinoic acid use. *Int. J. Cancer*, **70**, 194-200.
- GIGUERE, V., ONG, E.S., SEGUI, P. & EVANS, R.M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, **330**, 624-629.
- GLASS, C.K., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V. & ROSENFELD, M.G. (1988) The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, **54**, 313-323.
- GOODMAN, D.S. (1984) Plasma retinol-binding protein. *The Retinoids, ed1. New York, Academic Press*, 41-88.
- GORRY, P., LUFKIN, T., DIERICH, A., ROCHETTE-EGLY, C., DÉCIMO, D., DOLLÉ, P., MARK, M., DURAND, B. & CHAMBON, P. (1994) The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9032-9036.
- GRAUPNER, G., WILLS, K.N., TZUKERMAN, M., ZHANG, X.K. & PFAHL, M. (1989) Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature*, **340**, 653-656.
- GRAUPNER, G., MALLE, G., MAIGNAN, J., LANG, G., PRUNIERAS, M. & PFAHL, M. (1991) 6'-substituted naphthalene-2-carboxylic acid analogs, a new class of retinoic acid receptor subtype-specific ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1554-1561.
- GREEN, S. & CHAMBON, P. (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *TIG*, **4**, 309-314.
- GREEN, S., KUMAR, V., THEULAZ, I., WAHLI, W. & CHAMBON, P. (1988) The N-terminal DNA-binding "zinc finger" of the oestrogen and glucocorticoid receptor determines target gene specificity. *EMBO J.* **7**, 3037-3044.
- GREENBERG, B.R., DUNIE, B.D., BARNETT, T.C. & MEYSKENS, F.L. (1985) Phase I-II study of 13-cis retinoic acid in myelodysplastic syndromes. *Cancer Treat.* **67**, 369-374.
- GUDAS, L.J. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* **269**, 15399-15402.

- HAUSSLER, M.R., DONALDSON, C.A., KELLY, M.A., MANGELSDORF, D.J., BOWDEN, G.T., MEINKE, W.J., MEYSKENS, F.L. & SIDELL, N. (1984) Identification and quantification of intracellular retinol and retinoic acid binding proteins in cultured cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **803**, 54-62.
- HAZDIC, E., DESAI-YAJNIK, V., HALMER, E., GUO, S., WU, S., KOUDINOVA, N., CASANOVA, J., RAAKA, B.M. & SAMUELS, H.H. (1995) A 10-aminoacid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor α is essential for transcriptional activation and interaction with general transcription factor TFIIB. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4507-4517.
- HÄRD, T., KELLENBACH, E., BOELEN, R., MALER, B.A., DAHLAM, K., FREEDMAN, L.P., CARLSTEDT-DUKE, J., YAMAMOTO, K.R., GUSTAFSSON, J. & KAPTEIN, R. (1990) Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science*, 157-159.
- HEERY, D.M., KALKHOVEN, E., HOARE, S. & PARKER, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptor. *Nature*, **387**, 733-736.
- HENTTU, P.M.A., KALKHOVEN, E. & PARKER, M.G. (1997) AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1832-1839.
- HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A., STEIN, R.B., EICHELE, G., EVANS, R.M. & THALLER, C. (1992) 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, **68**, 397-406.
- HOLLENBERG, A.N., MONDEN, T. & WONDISFORD, F.E. (1995) Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J. Biol. Chem.* **270**, 14274-14280.
- HOLLENBERG, S.M., WEINBERGER, C., ONG, E.S., CERELLI, G., ORO, A., LEBO, R., THOMPSON, E.B., ROSENFELD, M.G. & EVANS, R.M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **318**, 635-641.
- HONG, W.K. & ITRI, L.M. (1994) Retinoids and human cancer. In: M.B. Sporn, AB Roberts and DS Goodman (eds), *The Retinoids*. New York: Raven Press, 597-658.
- HORLEIN, A.J., NAAR, A.M., HEINZEL, T., TORCHIA, J., GLOSS, B., KUROKAWA, R., RYAN, A., KAMEI, Y., SODERSTROM, M., GLASS, C.K. & ET AL (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397-404.
- HORN, V., MINUCCI, S., OGRYZKO, V.V., ADAMSON, E.D., HOWARD, B.H., LEVIN, A.A. & OZATO, K. (1996) RAR and RXR selective ligands cooperatively induce apoptosis and neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *FASEB*, **10**, 1071-1077.
- HUANG, C., MA, W., DAWSON, M.I., RINCON, M., FLAVELL, R.A. & DONG, Z. (1997) Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5826-5830.
- HUANG, M., YE, Y.C., CHEN, S.R., CHAIR, J.R., LU, J.X., ZHOA, L., GU, L.J. & WANG, Z.Y. (1988) Use of *all trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Blood*, **72**, 567-576.
- ISHIKAWA, T., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., ABURATANI, H., STANGER, B.Z., SHIBASAKI, Y., IMAWANI, M., EVANS, R.M. & TAKAKU, F. (1990) A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol. Endocrinol.* **4**, 837-844.

ISSING, W.J. & WUSTROW, T.P. (1996) Expression of retinoic acid receptors in squamous cell carcinomas and their possible implication for chemoprevention. *Anticancer Res.* **16**, 2373-2377.

IUPAC-IUB (1982) *Eur. J. Biochem.* **129**, 1-5.

JETTEN, A.M., ANDERSON, K., DEAS, M.A., KAGECHIKA, H., LOTAN, R., REARICK, J.I. & SHUDO, K. (1987) New benzoic acid derivatives with retinoid activity: lack of direct correlation between biological activity and binding to cellular retinoic acid binding protein. *Cancer Res.* **47**, 3523-3527.

JETTEN, A.M., NERVI, C. & VOLLBERG, T.M. (1992) Control of squamous differentiation in tracheobronchial and epidermal cells: role of retinoids. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **13**, 93-100.

JIANG, H., PENNER, J.D., BEARD, R.L., CHANDRARATNA, R.A.S. & KOCHHAR, D.M. (1995) Diminished teratogenicity of retinoid X receptor-selective synthetic retinoids. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 669-676.

JOHNSON, A.T., KLEIN, E.S., GILLETT, S.J., WANG, L., SONG, T.K., PINO, M.E. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1995) Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J. Med. Chem.*, **38**, 4764-4767.

JOHNSON, A.T., KLEIN, E.S., WANG, L., PINO, M.E. & CHANDRARATNA, R.A. (1996) Identification of retinoic acid receptor beta subtype specific agonists. *J. Med. Chem.* **39**, 5027-5030.

JORDAN, V.C. (1992) The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. *Cancer*, **70**, 977-982.

KAGECHIKA, H., HAWACHI, E., HASHIMOTO, Y., HIMI, T. & SHUDO, K. (1988) Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoid activity. *J. Med. Chem.* **31**, 2182-2192.

KAGECHIKA, H., HIMI, T., KAWACHI, E. & SHUDO, K. (1989a) Retinobenzoic acids. 4. Conformation of aromatic amides with retinoid activity. Importance of *trans*-amide structure for the activity. *J. Med. Chem.* **32**, 2292-2296.

KAGECHIKA, H., HIMI, T., NAMIKAWA, K., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y. & SHUDO, K. (1989b) Retinobenzoic acids. 3. Structure-activity relationships of retinoid azobenzene-4-carboxylic acids and stilbene-4-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **32**, 1098-1108.

KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y. & SHUDO, K. (1989c) Retinobenzoic acids. 2. Structure-activity relationships of chalcone-4-carboxylic acids and flavone-4'-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **32**, 834-840.

KAMEI, Y., XU, L., HEINZEL, T., TORCHIA, J., KUROKAWA, R., GLOSS, B., LIN, S., HEYMAN, R.A., ROSE, D.W., GLASS, C.K. & ROSENFELD, M.G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, **85**, 403-414.

KASTNER, P., KRUST, A., MENDELSON, C., GARNIER, J.M., ZELEN, A., LEROY, P., STAUB, A. & CHAMBON, P. (1990) Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific pattern of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2700-2704.

- KATAHIRA, M., KNEGTEL, R., SCHILTHIUS, J., BOELENS, R., EIB, D., VAN DER SAAG, P. & KAPTEIN, R. (1992) The structure of the human retinoic acid receptor- β DNA-binding domain determined by NMR. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 65-66.
- KATZENELLENBOGEN, J.A., O'MALLEY, B.W. & KATZENELLENBOGEN, B.S. (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as basis for cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* 10, 119-131.
- KEIDEL, S., LEMOTTE, P. & APFEL, C. (1994) Different agonist- and antagonist-induced conformational changes in retinoic acid receptors analyzed by protease mapping. *Mol. Cell. Biol.* 14, 287-298.
- KEIDEL, S., LAMOUR, F.P.Y. & APFEL, C.M. (1997) Mutational analysis reveals that all-*trans*-retinoic acid, 9-*cis*-retinoic acid, and antagonist interact with distinct binding determinants of RAR alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 18267-18272.
- KERSTEN, S., KELLEHER, D., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & NOY, N. (1995a) Retinoid X receptor α forms tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8645-8649.
- KERSTEN, S., PAN, L., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & NOY, N. (1995b) Role of ligand in retinoid signaling. 9-*cis*-retinoic acid modulates the oligomeric state of the retinoid X receptor. *Biochem.* 34, 13717-13721.
- KERSTEN, S., PAN, L. & NOY, N. (1995c) On the role of ligand in retinoid signaling: positive cooperativity in the interactions of 9-*cis* retinoic acid with tetramers of the retinoid X receptor. *Biochem.*, 34, 14263-14269.
- KERSTEN, S., DAWSON, M.I., LEWIS, B.A. & NOY, N. (1996) Individual subunits of heterodimers comprised of retinoic acid and retinoid X receptors interact with their ligands independently. *Biochem.* 35, 3816-3824.
- KERSTEN, S., RECZEK, P.R. & NOY, N. (1997) The tetramerization region of the retinoid X receptor is important for transcriptional activation by the receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 29759-29768.
- KHAVARI, P.A., PETERSON, C.L., TAMKUN, J.W., MENDEL, D.B. & GRABTREE, G.R. (1993) BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366, 170-174.
- KIZAKI, M., DAWSON, M.I., HEYMAN, R., ELSTER, E., MOROSETTI, R., PAKKALA, S., CHEN, D.L., UENO, H., CHAO, W., MORIKAWA, M., IKEDA, Y., HEBER, D., PFAHL, M. & KOEFFLER, H.P. (1996) Effects of novel retinoid X receptor-selective ligands on myeloid leukemia differentiation and proliferation *in vitro*. *Blood*, 87, 1977-1984.
- KLAHOLZ, B.P., RENAUD, J.P., MITSCHLER, A., ZUSI, C., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & MORAS, D. (1998) Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR γ . *Nature structural biology*, 5, 199-202.
- KLEIN, E.S., PINO, M.E., JOHNSON, A.T., DAVIES, P.J., NAGPAL, S., THACHER, S.M., KRASINSKI, G. & CHANDRARATNA, R.A. (1996) Identification and functional separation of retinoic acid receptor neutral antagonists and inverse agonists. *J. Biol. Chem.* 271, 22692-22696.

- KLIEWER, S.A., UMESONO, K., HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A. & EVANS, R.M. (1992a) Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1448-1452.
- KLIEWER, S.A., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J. & EVNS, R.M. (1992b) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D, signalling. *Nature*, **355**, 446-449.
- KLIEWER, S.A., UMESONO, K., NOOMAN, D.J., HEYMAN, R.A. & EVANS, P.M. (1992c) Convergence of 9-*c*RA and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**, 771-774.
- KLOCK, G., STRÄHLE, U. & SCHÜTZ, G. (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature*, **329**, 734-736.
- KNEGTEL, R.M., BOELEN, R., GANADU, M.L., GEORGE, A.V., KATAHIRA, M., BONVIN, A.M., EIB, D., VAN DER SAAG, P.T. & KAPTEIN, R. (1993) NMR studies of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain. Metal coordination and three-dimensional structure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **684**, 49-62.
- KOELLE, M.R., TALBOT, W.S. & SEGRAVES, W.A. (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, **67**, 59-77.
- KRUST, A., KASTNER, P., PETKOVICH, M., ZELENT, A. & CHAMBON, P. (1989) A third human retinoic acid receptor hRAR-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5310-5314.
- KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J.R. & CHAMBON, P. (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, **51**, 941-951.
- KUROKAWA, R., YU, V.C., NÄÄR, A., KYAKUMOTO, S., HAN, Z., SILVERMAN, S., ROSENFELD, M.G. & GLASS, C.K. (1993) Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes & Develop.* **7**, 1423-1435.
- KUROKAWA, R., DIRENZO, J., BOEHM, M., SUGARMAN, J., GLOSS, B., ROSENFELD, M.G., HEYMAN, R.A. & GLASS, C.K. (1994) Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature*, **371**, 528-531.
- KUROKAWA, R., SÖDERSTRÖM, M., HÖRLEIN, A., HALACHMI, S., BROWN, M., ROSENFELD, M.G. & GLASS, C.K. (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature*, **377**, 451-454.
- L'HORSET, F., DAUVOIS, S., HEERY, D.M., CAVAILLES, V. & PARKER, M.G. (1996) RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6029-6036.
- LAMA, G., ANGELUCCI, C., RECCHIA, F. & SICA, G. (1996) Combined effects of 13-*cis*-retinoic acid, tamoxifen and interferon on the growth of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **100**, 181-189.
- LAMOUR, F.P., LARDELLI, P. & APFEL, C.M. (1996) Analysis of the ligand-binding domain of human retinoic acid receptor alpha by site-directed mutagenesis. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5386-5392.

- LAMPRON, C., ROCHETTE-EGLY, C., DOLLÉ, P., MARK, M., LE MEUR, M. & CHAMBON, P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development*, **121**, 539-548.
- LAUDET, V. & STÉHELIN, D. (1992) Nuclear receptors: flexible friends. *Current Biology*, **2**, 293-295.
- LAUDET, V. (1997) Evolution of the nuclear receptorsuperfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endo.* **19**, 207-226.
- LA VISTA-PICARD, N., HOBBS, P.D., PFAHL, M. & DAWSON, M. I. (1996) The receptor-DNA complex determines the retinoid response : a mechanism for the diversification of theligand signal. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4137-4146.
- LE DOUARIN, B., ZECHEL, C., GARNIER, J., LUTZ, Y., TORA, L., PIERRAT, B., HEERY, D., GRONEMEYER, H., CHAMBON, P. & LOSSON, R. (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**, 2020-2033.
- LEE, J.W., RYAN, F., SWAFFIELD, J.C., JOHNSTON, S.A. & MOORE, D.D. (1995) Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature*, **374**, 91-94.
- LEE, M.O., LIU, Y. & ZHANG, X.K. (1995) A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormonal sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4194-4207.
- LEE, M.S., KLIEWER, S.A., PROVENCAL, J., WRIGHT, P.E. & EVANS, R.M. (1993) Structure of the retinoid-X-receptor- α DNA binding domain- α helix required for homodimeric DNA binding. *Science*, **260**, 1117-1121.
- LEE, S., NA, S., KIM, H., SOH, J., CHOI, H. & LEE, J.W. (1998) Identification of critical residues for heterodimerization within the ligand-binding domain of retinoid X receptor. *Mol. Endocrinol.* **12**, 325-332.
- LEFEBVRE, B., RACHEZ, C., FORMSTECHEP, P. & LEFEBVRE, P. (1994) Structural determinants of the ligand-binding site of the human retinoic acid receptor α . *Biochem.* **34**, 5477-5485.
- LEFEBVRE, B. (1997) Déterminants structuraux du récepteur humain α de l'acide rétinoïque impliqués dans la liaison au ligand et la modulation de son activité biologique. Lille. Thèse Sciences de la Vie et de la Santé.
- LEFEBVRE, B., MOUCHON, A., FORMSTECHEP, P. & LEFEBVRE, P. (1998) H11-H12 loopretinoic acid receptor mutants exhibit distinct trans-activating and trans-repressing activities in the presence of natural or synthetic retinoids. *Biochem.*, (in press).
- LEFEBVRE, P., GAUB, M., TAHAYATO, A., ROCHETTE-EGLY, E.C. & FORMSTECHEP, P. (1995) Protein phosphatases 1 and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 10806-10816.
- LEHMAN, J.M., DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., HUSMANN, M. & PFAHL, M. (1991) Identification of retinoids with nuclear receptor subtype-selective activities. *Cancer Res.* **51**, 4804-4809.
- LEHMANN, J.M., JONG, L., FANJUL, A., CAMERON, J.F., LU, X.P., HAEFNER, P., DAWSON, M.I. & PFAHL, M. (1992) Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways. *Science*, **258**, 1944-1946.

- LEID, M., KASTNER, P., LYONS, R., NAKSHATRI, H., SAUNDERS, M., ZACHAREWSKI, T., CHEN, J., STAUB, A., GARNIER, J., MADER, S. & CHAMBON, P. (1992) Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*, **68**, 377-395.
- LEMON, B.D. & FREEDMAN, L.P. (1996) Selective effects of ligands on vitamin D3 receptor- and retinoid X receptor-mediated gene activation *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1006-1016.
- LEMOTTE, P.K., KEIDEL, S. & APFEL, C.M. (1996a) Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur. J. Biochem.* **236**, 328-333.
- LEMOTTE, P.K., KEIDEL, S. & APFEL, C.M. (1996b) Characterization of synthetic retinoids with selectivity for retinoic acid or retinoid X nuclear receptors. *Biochem. Biophys. Acta*, **1289**, 298-304.
- LENG, X., BLANCO, J., TSAI, S.Y., OZTO, K., O'MALLEY, B.W. & TSAI, M. (1995) Mouse retinoid X receptor contains a separable ligand-binding and transactivation domain in its E region. *Mol. Cell Biol.* **15**, 255-263.
- LEONG, G., WANG, K.S., MARTON, M.J., BLANCO, J.C.G., WANG, I., ROLFES, R.J., OZATO, K. & SEGARS, J.H. (1998) Interaction between the retinoid X receptor and transcription factor IIB is ligand-dependent *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2296-2305.
- LEROY, P., KRUST, A., ZELENT, A., MENDELSON, C., GARNIER, J.M., KASTNER, P., DIERICH, A. & CHAMBON, P. (1991a) Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor α are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.* **10**, 71-81.
- LEROY, P., NAKSHATRI, H. & CHAMBON, P. (1991b) Mouse retinoic acid receptor $\alpha 2$ isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10138-10142.
- LEVIN, A.A., STURZENBECKER, L.J., KAZMER, S., BOSAKOWSKI, T., HUSELTON, C., ALLENBY, G., SPECK, J., KRATZEISEN, C., ROSENBERGER, M., LOVEY, A. & GRIPPO, F.J. (1992) 9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature*, **355**, 359-361.
- LI, H., LEO, C., SCHROEN, D.J. & CHEN, J.D. (1997) Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. *Mol. Endocrinol.* **11**, 2025-2037.
- LI, X., SHAO, Z., SHEIKH, S., EISEMAN, J.L., SENTZ, D., JETTEN, A.M., CHEN, J., DAWSON, M.I., AISNER, S., RISHI, A.K., GUTIERREZ, P., SCHNAPPER, L. & FONTANA, J.A. (1995) Retinoic acid nuclear receptor β inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 449-458.
- LIN, B.C., WONG, C.W., CHEN, H.W. & PRIVALSKY, M.L. (1997) Plasticity of tetramer formation by retinoid X receptors - an alternative paradigm for DNA recognition. *J. Biol. Chem.* **272**, 9860-9867.
- LOELIGER, P., BOLLAG, W. & MAYER, H. (1980) Arotinoids, a new class of highly active retinoids. *Eur. J. Med. Chem.* **15**, 9-15.
- LOHNES, D., MARK, M., MENDELSON, C., DOLLE, P., DECIMO, D., LEMEURE, M., DIERICH, A., GORRY, P. & CHAMBON, P. (1995) Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 475-486.

- LUISI, B.F., XU, W.X., OTWINOWSKI, Z., FREEDMAN, L.P., YAMAMOTO, K.R. & SIGLER, P.B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **352**, 497-505.
- LUPISELLA, J.A., DRISCOLL, J.E., METZLER, W.J. & RECZEK, P.R. (1995) The ligand binding domain of the human retinoic acid receptor gamma is predominantly alpha-helical with a Trp residue in the ligand binding site. *J. Biol. Chem.* **270**, 24884-24890.
- MADER, S., KUMAR, V., DE VERNEUIL, H. & CHAMBON, P. (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature*, **338**, 271-274.
- MADER, S., CHEN, J., CHEN, Z., WHITE, J., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1993) 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. *EMBO J.* **12**, 5029-5041.
- MALABA, L., KINDBERG, G.M., NORUM, K.R., BERG, T. & BLOMHOFF, R. (1993) Receptor-mediated endocytosis of retinol-binding protein by liver parenchymal cell: interference by radioactive iodination. *Biochem. J.* **291**, 187-191.
- MANGELSDORF, D.J., ONG, E.S., DYCK, J.A. & EVANS, R.M. (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, **345**, 224-229.
- MANGELSDORF, D.J., BORGMAYER, U., HEYMAN, R.A., ZHOU, J.Y., ONG, E.S., ORO, A.E., KAKIZUKA, A. & EVANS, R.M. (1991a) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes & Develop.* **6**, 329-344.
- MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K., KLIEWER, S.A., BORGMAYER, V., ONG, E.S. & EVANS, R.M. (1991b) A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*, **66**, 555-561.
- MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K. & EVANS, R.M. (1994) The retinoid receptors. In: Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S., eds. *The retinoids*, 2nd ed. New York: Raven Press, 319-349.
- MANGELSDORF, D.J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBON, P. & EVANS, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- MARKS, M.S., HALLENBECK, P.L., NAGATA, T., SEGARS, J.H., APPELLA, E., NIKODEM, V.M. & OZATO, K. (1992) H-2RIIBP (RXR β) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *EMBO J.* **11**, 1419-1435.
- MARTIN, B., BERNARDON, J., CAVEY, M., BERNARD, B., CARLAVAN, I., CHARPENTIER, B., PILGRIM, W.R., SHROOT, B. & REICHERT, U. (1992) Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors. *Skin Pharmacol.* **5**, 57-65.
- MARTINEZ, E., GIVEL, F. & WAHLI, W. (1987) The estrogen-responsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. *EMBO J.* **6**, 3719-3727.
- MCPHIE, P., PARKINSON, C., LEE, B.K. & CHENG, S. (1993) Structure of the hormone binding domain of human β 1 thyroid hormone nuclear receptor: is it an α/β barrel? *Biochem.* **32**, 7460-7465.

- MEANS, A.L. & GUDAS, L.J. (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 201-233.
- MILLER, V.A., BENEDETTI, F.M., RIGAS, J.R., VERRET, A.L., PFISTER, D.G., STRAUS, D., KRIS, M.G., CRISP, M., HEYMAN, R., LOEWEN, G.R., TRUGLIA, J.A. & WARREL, J.R.P. (1997) Initial clinical trial of a selective retinoid X receptor ligand, LGD1069. *Journal of Clin. Oncology*, **15**, 790-795.
- MINUCCI, S., LEID, M., TOYAMA, R., SAINT JEANNET, J.P., PETERSON, V.J., HORN, V., ISHMAEL, J.E., BHATTACHARYYA, N., DEY, A., DAWID, I.B. & OZATO, K. (1997) Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol. Cell Biol.* **17**, 644-655.
- MINUCCI, S. & OZATO, K. (1997) Retinoid receptors in transcriptional regulation. *Differentiation and gene regulation*, 567-574.
- MIZOJIRI, K., OKABE, H., SUGENO, K., ESUMI, Y., TAKAICHI, M., HARADA, T., SEKI, H. & INABA, A. (1997a) Studies on the metabolism and disposition of the new retinoid 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl] benzoic acid - 3rd communication: placental transfer and excretion into milk in rats. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **47**, 201-208.
- MIZOJIRI, K., OKABE, H., SUGENO, K., ESUMI, Y., TAKAICHI, M., OKAMURA, Y., KASHIWAZAKI, K. & TAKAHASHI, N. (1997b) Studies on the metabolism and disposition of the new retinoid 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl]benzoic acid .5th communication: factors affecting percutaneous absorption in rats. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **47**, 270-275.
- MIZOJIRI, K., OKABE, H., SUGENO, K., ESUMI, Y., TAKAICHI, M., TSUTSUMI, S., HARADA, T., MIYOSHI, R. & INABA, A. (1997c) Studies on the metabolism and disposition of the new retinoid 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl] benzoic acid - 2nd communication: absorption, distribution and excretion after single and consecutive subcutaneous administration in rats. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **47**, 195-200.
- MIZOJIRI, K., OKABE, H., SUGENO, K., MISAKI, A., ITO, M., KOMINAMI, G., ESUMI, Y., TAKAICHI, M., HARADA, T., SEKI, H. & INABA, A. (1997d) Studies on the metabolism and disposition of the new retinoid 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl] benzoic acid .4th communication: absorption, metabolism, excretion and plasma protein binding in various animals and man. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **47**, 259-269.
- MIZOJIRI, K.J., OKABE, H., SUGENO, K., ESUMI, Y., TAKAICHI, M., MIYAKE, T., SEKI, H. & INABA, A. (1997e) Studies on the metabolism and disposition of the new retinoid 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl] benzoic acid - 1st communication: absorption, distribution, metabolism and excretion after topical application and subcutaneous administration in rats. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **47**, 59-69.
- MODARRESS, K.J., OPOKU, J., XU, M., SARLIS, N.J. & SIMONS, S.S. (1997) Steroid-induced conformational changes at ends of the hormone-binding domain in the rat glucocorticoid receptor are independent of agonist versus antagonist activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 23986-23994.
- MORRIS-KAY, G. (1992) Retinoic acid receptors in normal growth and development. *Cancer Surv.* **14**, 181-193.

- MUCHARDT, C. & YANIV, M. (1993) A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**, 4279-4290.
- MUNOZ-CANOVES, P., VIK, D.P. & TACK, B.F. (1990) Mapping of retinoic acid-response element in the promoter region of the complement factor H gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 20065-20068.
- NAGPAL, S., SAUNDERS, M., KASTNER, P., DURAND, B., NAKSHATRI, H. & CHAMBON, P. (1992) Promoter context-dependent and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*, **70**, 1007-1019.
- NAGPAL, S., ZELENT, A. & CHAMBON, P. (1992) RAR- β 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- β 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2718-2722.
- NAGPAL, S., FRIANT, S., NAKSHATRI, H. & CHAMBON, P. (1993) RARs and RXRs evidence for 2 autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization *in vivo*. *EMBO J.* **12**, 2349-2360.
- NAPOLI, J.L., BOERMAN, M.H.E.M., CHAI, X., ZHAI, Y. & FIORELLA, P.D. (1995) Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **53**, 497-502.
- NELSON, C.C., HENDY, S.C., FARIS, J.S. & ROMANIUK, P.J. (1996) Retinoid X receptor alters the determination of DNA binding specificity by the P-box amino acids of the thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 19464-19474.
- NOJI, S., NOHNO, T., KOYAMA, E., MUTO, K., OHYAMA, K., AOKI, Y., TAMURA, K., OHSUGI, K., IDE, H., TANIGUCHI, S. & SAITO, T. (1991) Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature*, **350**, 83-86.
- OKABE, I., BALEY, L.C., ATTREE, O., SRINIVASAN, S., PERKEL, J.M., LAURENT, B.C., CARLSON, M., NELSON, D.L. & NUSSBAUM, R.L. (1996) Cloning of human and bovine homologs of SNF2/SWI2, a global activator of transcription in yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.* **20**, 4649-4655.
- OLSON, J.A. (1998) Provitamin A function of carotenoids. *Journal of Nutrition*, **119**, 105-108.
- ONATE, S.A., TSAI, S.Y., TSAI, M.J. & O'MALLEY, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- ONG, D.E. & CHYTIL, F. (1978) Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4551-4554.
- ONG, E.D., NEWCOMER, M.E. & CHYTIL, F. (1994) Cellular retinoid-binding proteins. *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*, ed2. New York, Raven Press, 365-424.
- ORFANOS, C.E., ZOUBOULIS, C.C., ALMONDROESLER, B. & GEILEN, C.C. (1997) Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs*, **53**, 358-388.
- ORO, A., MCKEOWN, M. & EVANS, R.M. (1990) Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*, **347**, 298-301.

- OSTROWSKI, J., HAMMER, L., ROALSVIG, T., POKORNOWSKI, K. & RECZEK, P.R. (1995) The N-terminal portion of domain E of retinoic acid receptors alpha and beta is essential for the recognition of retinoic acid and various analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1812-1816.
- OSTROWSKI, J., ROALSVIG, T., HAMMER, L., MARINIER, A., STARRETT, J.E., YUO, K.L. & RECZEK, P.R. (1998) Serine 232 and methionine 272 define the ligand binding pocket in retinoic acid receptor subtypes. *J Biol. Chem.* **273**, 3490-3495.
- PEET, D.J., DOYLE, D.F., COREY, D.R. & MANGELSDORF, D.J. (1998) Engineering novel specificities for ligand-activated transcription in the nuclear hormone receptor RXR. *Chem. Biol.*, **5**, 13-21.
- PERLMANN, T., RANGARAJAN, P.N., UMESONO, K. & EVANS, R.M. (1993) Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes & Develop.* **7**, 1411-1422.
- PETKOVITCH, M., BRAND, N.J., KRUST, A. & CHAMBON, P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of the nuclear receptors. *Nature*, **330**, 444-450.
- PREDKI, P.F., ZAMBLE, D., SARKAR, B. & GIGUERE, V. (1994) Ordered binding of retinoic acid and retinoid-X receptors to asymmetric response element involves determinants adjacent to the DNA-binding domain. *Mol. Endocrinol.* **8**, 31-39.
- RASTINEJAD, F., PERLMANN, T., EVANS, R.M. & SIGLER, P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, **375**, 203-211.
- RECCHIA, F., REA, S., CORRAO, G., FINGERHUT, A. & FRATI, L. (1995) Sequential chemotherapy, beta interferon, retinoids and tamoxifen in the treatment of metastatic breast cancer. A pilot study. *Eur. J. Cancer*, **31A**, 1887-1888.
- RECZEK, P.R., OSTROWSKI, J., YU, K.L., CHEN, S., HAMMER, L., ROALSVIG, T., STARRETT, J.E., DRISCOLL, J., WHITING, G., SPINAZZI, P., TRAMPOSCH, K.M. & MANSURI, M.M. (1995) The role of retinoic acid receptor gamma and the rhino mouse and rabbit irritation models of retinoid activity. *Skin Pharmacol.* **8**, 1-4.
- REESE, J.C., WOOG, C.H. & KATZENELLENBOGEN, B.S. (1992) Identification of two cysteines closely positioned in the ligand-binding pocket of the human estrogen receptor: roles in ligand binding and transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* **6**, 2160-2166.
- REICHRATH, J., MITTMANN, M.I., KAMRADT, J. & MULLER, S.M. (1997) Expression of retinoid-X receptors (-alpha,-beta,-gamma) and retinoic acid receptors (-alpha,-beta,-gamma) in normal human skin: an immunohistological evaluation. *Histochem. J.* **29**, 127-133.
- RENAUD, J.P., ROCHEL, N., RUFF, M., VIVAT, V., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & MORAS, D. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, **378**, 681-689.
- ROSEWICZ, S., STIER, U., BREMBECK, F., KAISER, A., PAPADIMITRIOU, C.A., BERDEL, W.E., WIEDENMANN, B. & RIECKEN, E. (1995) Retinoids: effects on growth, differentiation, and nuclear receptor expression in human pancreatic carcinoma cell lines. *Gastroenterology*, **109**, 1646-1660.
- ROY, B., TANEJA, R. & CHAMBON, P. (1995) Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR α)-RAR β , or RAR γ -selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6481-6487.

- RUBERTE, E., DOLLÉ, P., CHAMBON, P. & MORRISS-KAY, G. (1991) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development*, **111**, 45-60.
- SABLONNIERE, B., DALLERY, N., GRILLIER, I., FORMSTECHE, P. & DAUTREVAUX, M. (1994) Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement. *Analytical Biochem.*, **217**, 110-118.
- SAITOU, M., NARUMIYA, S. & KAKIZUKA, A. (1994) Alteration of a single amino acid residue in retinoic acid receptor causes dominant-negative phenotype. *J. Biol. Chem.* **269**, 19101-19107.
- SANI, B.P., SINGH, R.K., REDDY, L.G. & GAUB, M. (1990) Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoic acid receptors from chick skin. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 107-113.
- SAP, J., MUNOZ, A., SCHMITT, J., STUNNENBERG, H. & VENNSTRÖM, B. (1989) Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the *v-erb-A* oncogene product. *Nature*, **340**, 242-244.
- SATO, M., SHUDO, K. & HIRAGUN, A. (1988) Functional studies of newly synthesized benzoic acid derivatives: identification of highly potent retinoid-like activity. *J. Cell. Physiol.* **135**, 179-188.
- SAUNDERS, J.W. & GASSELING, M.T. (1968) Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial-mesenchymal interactions*, 78-97.
- SCAFONAS, A., WOLFGANG, C.L., GABRIEL, J.L., SOPRANO, K.J. & SOPRANO, D.R. (1997) Differential role of homologous positively charged amino acid residues for ligand binding in retinoic acid receptor alpha compared with retinoic acid receptor beta. *J. Biol. Chem.* **272**, 11244-11249.
- SCHULMAN, I.G., CHAKRAVARTI, D., JUGUILON, H., ROMO, A. & EVANS, R.M. (1995) Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8288-8292.
- SCHÜLE, R., RANGARAJAN, P., YANG, N., KLIEWER, S., RANSONE, L.J., BOLADO, J., VERMA, I.M. & EVANS, R.M. (1991) Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6092-6096.
- SCHWABE, J.W.R., CHAPMAN, L., FINCH, J.T. & RHODES, D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **75**, 567-578.
- SEOL, W., CHOI, H.S. & MOORE, D.D. (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* **9**, 72-85.
- SHROOT, B. & MICHEL, S. (1997) Pharmacology and chemistry of adapalene. *Am. Acad. Dermatol., Inc.* 96-103.
- SHUDO, K. & KAGECHIKA, H. (1990) Structure-activity relationships of a new series of synthetic retinoids (retinobenzoic acids). In *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*; CRC Press, Inc.: Boca Raton, F.L. 275-286.
- SHUDO, K. & KAGECHIKA, H. (1993) Structural evolution of retinoids. *Advances in drug research*, **24**, 81-119.

- SIEGENTHALER, G. (1996) Extra- and intracellular transport of retinoids : a reappraisal. *Hormone Res.* **45**, 122-127.
- SMITH, W.C., NAKSHATRI, H., LEROY, P., REES, J. & CHAMBON, P. (1991) A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinoid binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J.* **10**, 2223-2230.
- SOPRANO, D.R. & BLANER, W.S. (1994) Plasma retinol-binding protein. *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine. ED2. New York, Raven Press*, 257-282.
- SOPRANO, D.R., CHEN, L.X., WU, S., DONIGAN, A.M., BORGHAEI, R.C. & SOPRANO, K.J. (1996) Overexpression of both RAR and RXR restores AP-1 repression in ovarian adenocarcinoma cells resistant to retinoic acid-dependent growth inhibition. *Oncogene*, **12**, 577-584.
- SPORN, M.B., ROBERT, A.B., ROCHE, N.S., KAGECHIKA, H. & SHUDO, K. (1986) Mechanism of action of retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **15**, 756-764.
- STANDEVEN, A.M., JOHNSON, A.T., ESCOBAR, M. & CHANDRARATNA, R.A. (1996) Specific antagonist of retinoid toxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138**, 169-175.
- STELLER, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, **267**, 1445-1449.
- SUN, S., YUE, P., DAWSON, M.I., SHROOT, B., MICHEL, S., LAMPH, W.W., HEYMAN, R.A., TENG, M., CHANDRARATNA, R.A.S., SHUDO, K., HONG, W.K. & LOTAN, R. (1997) Differential effects of synthetic nuclear retinoid receptor-selective retinoids on the growth of human non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* **57**, 4931-4939.
- TAHAYATO, A., LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P. & DAUTREVAUX, M. (1993) A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1642-1653.
- TAIRIS, N., GABRIEL, J.L., SOPRANO, K.J. & SOPRANO, D.R. (1995) Alteration in the retinoid specificity of retinoic acid receptor-beta by site-directed mutagenesis of Arg269 and Lys220. *J. Biol. Chem.* **270**, 18380-18387.
- TAKAGI, K., SUGANUMA, M., KAGECHIKA, H., SHUDO, K., NINOMIYA, M., MUTO, Y. & FUJIKI, H. (1988) Inhibition of ornithine decarboxylase induction by retinobenzoic acids in relation to their binding affinities to cellular retinoid-binding proteins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **114**, 221-224.
- TAKASE, S., ONG, D.E. & CHYTIL, F. (1986) Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 328-334.
- TAKATSUKA, J., TAKAHASHI, N. & DE LUCA, L.M. (1996) Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: an unexpected liaison. *Cancer Res.* **56**, 675-678.
- TANENBAUM, D.M., WANG, Y., WILLIAMS, S.P. & SIGLER, P.B. (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5998-6003.
- TANEJA, R., ROCHETTE-EGLY, C., PLASSAT, J., PENNA, L., GAUB, M. & CHAMBON, P. (1997) Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR α and RAR γ is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *EMBO J.* **16**, 6452-6465.

TATE, B.F., ALLENBY, G., JANOCZA, R., KAZMER, S., SPECK, J., STURZENBECKER, L.J., ABARZUA, P., LEVIN, A.A. & GRIPPO, J.F. (1994) Distinct binding determinants for 9-*cis*retinoic acid are located within AF-2 of retinoic acid receptor α . *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2323-2330.

TATE, B.F. & GRIPPO, J.F. (1995) Mutagenesis of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor α identifies critical residues for 9-*cis*-retinoic acid binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 20258-20263.

TATE, B.F., ALLENBY, G., PEREZ, J.R., LEVIN, A.A. & GRIPPO, J.F. (1996) A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor α reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *FASEB J.* **10**, 1524-1531.

TENG, M., DUONG, T.T., KLEIN, E.S., PINO, M.E. & CHANDRARATNA, R.A. (1996) Identification of a retinoic acid receptor α subtype specific agonist. *J. Med. Chem.* **39**, 3035-3038.

TENG, M., DUONG, T.T., JOHNSON, A.T., KLEIN, E.S., WANG, L., KHALIFA, B. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1997) Identification of highly potent retinoic acid receptor α -selective antagonists. *J. Med. Chem.* **40**, 2445-2451.

THENOT, S., HENRIQUET, C., ROCHEFORT, H. & CAVAILLES, V. (1997) Differential interaction of nuclear receptors with the putative human transcriptional coactivator hTIF1. *J. Biol. Chem.* , **272**, 12062-12068.

TICKLE, C., ALBERTS, B., WOLPERT, L. & LEE, J. (1982) Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature*, **296**, 564-566.

TREMBLAY, G.B., TREMBLAY, A., LABRIE, F. & GIGUERE, V. (1998) Ligand-independent activation of the estrogen receptors α and β by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res.* **58**, 877-881.

UMESONO, K., GIGUERE, V., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. & EVANS, R.M. (1988) Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature*, **336**, 262-265.

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

UMESONO, K., MURAKAMI, K.K., THOMPSON, C.C. & EVANS, R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*, **65**, 1255-1266.

VASIOS, G.W., MADER, S., GOLD, J.D., LEID, M., LUTZ, Y., GAUB, M.P., CHAMBON, P. & GUDAS, L.J. (1991) The late retinoic acid induction of laminin B1 gene transcription involves RAR binding to the responsive element. *EMBO J.* **10**, 1149-1158.

VENEPALLY, P., REDDY, L.G. & SANI, B.P. (1996) Analysis of the effects of CRABP I expression on the RA-induced transcription mediated by retinoid receptors. *Biochemistry*, **35**, 9974-9982.

VESOLE, D., KOMBLUTH, J. & JAGANNATH, S. (1993) Biological response modifiers (BRM) in refractory multiple myeloma (MM): lack of clinical efficacy of recombinant human interleukin-4 (rh IL-4) and all-*trans* retinoic acid (ATRA). *Blood*, **82** (suppl 1), 263a

- VIVAT, V., GOFFLO, D., GARCIA, T., WURTZ, J., BOURGUET, W., PHILIBERT, D. & GRONEMEYER, H. (1997a) Sequences in the ligand-binding domains of the human androgen and progesterone receptors which determine their distinct ligand identities. *J. Mol. Endocrinol.*, **18**, 147-160.
- VIVAT, V., ZECHEL, C., WUTRZ, J., BOURGUET, W., KAGECHIKA, H., UMEMIYA, H., SHUDO, K., MORAS, D., GRONEMEYER, H. & CHAMBON, P. (1997b) A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* **16**, 5697-5709.
- VOEGEL, J.J., HEINE, M.J.S., ZECHEL, C., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1996) TIF-2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.*, **15**, 3667-3675.
- VOEGEL, J.J., HEINE, M.J.S., TINI, M., VIVAT, V., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and - independent pathways. *EMBO J.* **17**, 507-519.
- VOM BAUR, E., ZECHEL, C., HEERY, D., HEINE, M.J., GARNIER, J.M., VIVAT, V., LE DOUARIN, B., GRONEMEYER, H., CHAMBON, P. & LOSSON, R. (1996) Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* **15**, 110-124.
- VULIGONDA, V., LIN, Y. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1996) Synthesis of highly potent RXR-specific retinoids: the use of a cyclopropyl group as a double bond isostere. *Bioorg. and Med. Chem. Lett.* **6**, 213-218.
- WAGNER, B.L., POLLIO, G., LEONHARDT, S., WANI, M.C., LEE, D.Y., IMHOF, M.O., EDWARDS, D.P., COOK, C.E. & MCDONNELL, D.P. (1996) 16 alpha-substituted analogs of the antiprogestin RU486 induce a unique conformation in the human progesterone receptor resulting in mixed agonist activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8739-8744.
- WAGNER, R.L., APRILETTI, J.W., MCGRATH, M.E., WEST, B.L., BAXTER, J.D. & FLETTERICK, R.J. (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, **378**, 690-697.
- WANEK, N., GARDNIER, D.M., MUNEOKA, K. & BRYANT, S.V. (1991) Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature*, **350**, 81-83.
- WANG, L., TSAI, S.Y., COOK, R.G., BEATTIE, W., TSAI, M. & O'MALLEY, B.W. (1989) COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, **340**, 163-166.
- WEIGEL, N.L. (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *J. Biochem.* **319**, 657-667.
- WEINSTEIN, G.D., KRUEGER, G.G., LOWE, N.J., DUVIC, M., FRIEDMAN, D.J., JEGASOTHY, B.V., JORIZZO, J.L., SHMUNES, E., TSCHEN, E.H., LEWKAYA, D.A., LUE, J.C., SEFTON, J., GIBSON, J.R. & CHANDRARATNA, R.A.S. (1997) Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: Vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. *J. Am. Acad. Dermatol.* **37**, 85-92.
- WHITE, R., SJOBERG, M., KALKHOVEN, E. & PARKER, M.G. (1997) Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J.* **16**, 1427-1435.

WIDSCHWENDTER, M., BERGER, J., DAXENBICHLER, G., MÜLLER-HOLZNER, E., WIDSCHWENDTER, A., MAYR, A., MARTH, C. & ZEIMET, A.G. (1997a) Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res.* **57**, 4158-4161.

WIDSCHWENDTER, M., DAXENBICHLER, G., CULIG, Z., MICHEL, S., ZEIMET, A.G., MORTL, M.G., WIDSCHWENDTER, A. & MARTH, C. (1997b) Activity of retinoic acid receptor-gamma selectively binding retinoids alone and in combination with interferon-gamma in breast cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, **71**, 497-504.

WILLHITE, C.C., DAWSON, M.I. & REICHERT, U. (1996) Receptor-selective retinoid agonists and teratogenic activity. *Drug metabolism reviews*, **28**, 105-119.

WILLIAMS, S.P. & SIGLER, P.B. (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*, **393**, 392-396.

WILSON, T.E., PAULSEN, R.E., PADGETT, K.A. & MILBRANDT, J. (1992) Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science*, **256**, 107-110.

WOLFGANG, C.L., ZHANG, Z., GABRIEL, J.L., PIERINGER, R.A., SOPRANO, K.J. & SOPRANO, D.R. (1997) Identification of sulfhydryl-modified cysteine residues in the ligand binding pocket of retinoic acid receptor beta. *J. Biol. Chem.* **272**, 746-753.

WU, Q., DAWSON, M.I., ZHENG, Y., HOBBS, P.D., AGADIR, A., JONG, L., LI, Y., LIU, R., LIN, B. & ZHANG, X. (1997) Inhibition of *trans*-retinoic acid-resistance human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6598-6608.

WU, R., MARTIN, W., ROBINSON, C., ST GEORGE, J., PLOPPER, C., KURLAN, G., LAST, J., CROSS, C., MC DONALD, R. & BOUCHARD, R. (1990) Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **3**, 467-478.

WURTZ, J.M., BOURGUET, W., RENAUD, J.P., VIVAT, V., CHAMBON, P., MORAS, D. & GRONEMEYER, H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology*, **3**, 87-94.

WURTZ, J.M., EGNER, U., HEINRICH, N., MORAS, D. & MUELLERFAHRNOW, H. (1998) Three-dimensional models of estrogen receptor ligand binding domain complexes, based on related crystal structures and mutational and structure-activity relationship data. *J. Med. Chem.*, **41**, 1805-1814.

YAMAKAWA, T., KAGECHIKA, H., KAWACHI, E., HASHIMOTO, Y. & SHUDO, K. (1990) Retinobenzoic acids. 5. Retinoidal activities of compounds having a trimethylsilyl or trimethylgermyl groups in human promyelocytic leukaemia cells HL-60. *J. Med. Chem.* **33**, 1430-1437.

YAO, T.P., KU, G., ZHON, N., SCULLY, R. & LIVINGSTON, D.M. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10626-10631.

YOSHIMURA, H., NAGAI, M., HIBI, S., KIKUCHI, K., ABE, S., HIDA, T., HIGASHI, S., HISHINUMA, I. & YAMANAKA, T. (1995) A novel type of retinoic acid receptor antagonist: synthesis and structure-activity relationships of heterocyclic ring-containing benzoic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **38**, 3163-3173.

YU, K.L., SPINAZZE, P., OSTROWSKI, J., CURRIER, S.J., PACK, E.J., HAMMER, L., ROALSVIG, T., HONEYMAN, J.A., TORTOLANI, D.R., RECZEK, P.R., MANSURI, M.M. & STARRETT, J.E., JR.

(1996) Retinoic acid receptor beta,gamma-selective ligands: synthesis and biological activity of 6-substituted 2-naphthoic acid retinoids. *J. Med. Chem.* **39**, 2411-2421.

YU, V.C., DELSERT, C., ANDERSEN, B., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V., NÄÄR, A.M., KIM, S.Y., BOUTIN, J., GLASS, C.K. & ROSENFELD, M.G. (1991) RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, **67**, 1251-1266.

ZECHEL, C., SHEN, X., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1994a) Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* **13**, 1414-1424.

ZECHEL, C., SHEN, X., CHEN, J., CHEN, Z., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. (1994b) The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* **13**, 1425-1433.

ZEINER, M. & GEHRING, U. (1995) A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11465-11469.

ZELENT, A., KRUST, A., PETKOVICH, M., KASTNER, P. & CHAMBON, P. (1989) Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor predominantly expressed in skin. *Nature*, **339**, 714-717.

ZELENT, A., MENDELSON, C., KASTNER, P., KRUST, A., GARNIER, J., RUFFENACH, F., LEROY, P. & CHAMBON, P. (1991) Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.* **10**, 71-81.

ZHANG, L., NADZAN, A.M., HEYMAN, R.A., LOVE, D.L., MAIS, D.E., CROSTON, G., LAMPH, W.W. & BOEHM, M.F. (1996) Discovery of novel retinoic acid receptor agonists having potent antiproliferative activity in cervical cancer cells. *J. Med. Chem.* **39**, 2659-2663.

ZHANG, X., HOFFMANN, B., TRAN, P.B., GRAUPNER, G. & PFAHL, M. (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature*, **355**, 441-449.

LISTES DES ILLUSTRATIONS

REVUE GENERALE

- Fig. 1 :** Structure des rétinoïdes naturels (Means A.L. et Gudas L.J., 1995)
- Fig. 2 :** Métabolisme et mécanisme d'action des rétinoïdes
- Fig. 3 :** Polarisation antéro-postérieure des membres par le mésenchyme postérieur des bourgeons de membres (Hofmann C. et Eichele G., 1994)
- Fig. 4 :** Translocation chromosomique dans l'APL (Mangelsdorf D.J. et *al.*, 1994)
- Tab. 1 :** Définition des termes caractérisant les ligands
- Fig. 5 :** ligands synthétiques agonistes des RARs
- Fig. 6 :** Ligands sélectifs de RAR α
- Fig. 7 :** Ligands sélectifs de RAR β/γ
- Fig. 8 :** Ligands sélectifs de RAR β
- Fig. 9 :** Ligands sélectifs de RAR γ
- Tab. 2 :** K_d/K_i et EC₅₀ de ligands sélectifs des RARs
- Fig. 10 :** Ligands antagonistes des RARs
- Fig. 11 :** Ligands spécifiques de RXRs
- Fig. 12 :** Ligand antagoniste de RXR(homodimère)
- Tab. 3 :** Structures et activités anti AP-1 de rétinoïdes spécifiques (Fanjul A. et *al.*, 1994)
- Fig. 13 :** Ligands panagonistes
- Fig. 14 :** Un puissant ligand à activité anti AP-1
- Fig. 15 :** Organisation générale des récepteurs nucléaires
- Fig. 16 :** Comparaison d'homologies de séquences entre les membres de la famille des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf D.J., 1994)
- Fig. 17 :** Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires (Laudet V., 1997)
- Fig. 18 :** Homologies de séquences entre les sous-classes des RARs et des RXRs (Mangelsdorf D.J., 1994)
- Fig. 19 :** Isoformes de RAR α , β et γ (Leid M. et *al.*, 1993)
- Tab. 4 :** Isoformes, localisation chromosomique et expression tissulaire des RARs et RXRs
- Fig. 20 :** Structure cristallographique de l'apo LBD-RXR α (Bourguet W. et *al.*, 1995)
- Fig. 21 :** Structure cristallographique de l'holo LBD-RAR γ (Renaud J.P. et *al.*, 1995)
- Fig. 22 :** Représentation schématique des domaines de liaison de hRXR α et de hRAR γ (Renaud J.P. et *al.*, 1995)
- Fig. 23 :** Alignement de séquences du domaine E des RARs et des RXRs
- Fig. 24 :** Les résidus d'acides aminés de la LBP de hRAR γ en contact avec *t*-RA (Renaud J.P. et *al.*, 1995)
- Fig. 25 :** Modèle de l'interaction moléculaire entre RAR et des rétinoïdes sélectifs (Ostrowski J. et *al.*, 1998)
- Tab. 5 :** Acides aminés identifiés par mutagenèse jouant un rôle dans l'activation des RARs
- Fig. 26 :** Positionnement dans le modèle LBD-hRAR γ des acides aminés déterminant dans la liaison au ligand
- Fig. 27 :** Positionnement dans le modèle LBD-hRAR γ des acides aminés extérieurs à la LBP jouant un rôle dans l'activité du récepteur
- Fig. 28 :** Flexibilité des ligands dans le site de liaison
- Fig. 29 :** Modèle cristallographique du LBD-ER en présence d'un ligand agoniste et d'un ligand antagoniste (Bzozowski A.M. et *al.*, 1997)
- Fig. 30 :** Structure du domaine de liaison à l'ADN de hRAR α (Représentation schématique d'après Lefebvre B, 1997)

Fig. 31 : Exemples d'éléments de réponse

Fig. 32 : Modèles des hétérodimères RXR/RAR ou RXR/TR sur leurs éléments de réponse (Zechel C. et *al.*, 1994)

Fig. 33 : Régulation de la transcription par les cofacteurs (Minucci S. et Ozato K., 1996)

RESULTATS ET DISCUSSION

Fig. 34 : Nitration du résidu de tyrosine par le TNM

Tab. 6 : Concentration en TNM nécessaire pour obtenir 50% d'inactivation de liaison spécifique au ligand au récepteur

Tab. 7 : Mesure de l'activité de liaison résiduelle de RAR α , β et γ protégés par différents ligands contre l'action du TNM

Fig. 35 : Protéolyses limitées de RAR α en présence de différents ligands agonistes et d'un antagoniste par la trypsine, l'endoprotéase Lys-C et l'endoprotéase Arg-C

Fig. 36 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 208 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

Fig. 37 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 277 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

Fig. 38 : Spectres de masse des peptides contenant la tyrosine 362 traités par le TNM, (a) en absence de *t*-RA, (b) en présence de *t*-RA

Fig. 39 : Encombrement stérique entre le groupement NO₂ de la tyrosine 279 nitrée et la chaîne latérale de la leucine 319

Fig. 40 : Surfaces de Connolly montrant l'accessibilité au solvant des trois résidus de tyrosine 210, 279 et 364 (en jaune) sur RAR γ (a) et sur les acides aminés correspondants de RXR α (b)

Fig. 41 : Position de la cystéine 276 par rapport à la tyrosine 279 dans le LBD-hRAR γ (Modélisation moléculaire)

Fig. 42 : Surfaces de Connolly pour les résidus de cystéine 237 et 276

Fig. 43 : Acides aminés à 5 Å du carbone α de la cystéine 276 (a) et de la cystéine 237 (b) (Modélisation moléculaire sur le LBD-hRAR γ)

Fig. 44 : Courbe de saturation et de Scatchard du mutant Y277F avec *t*-RA

Tab. 8 : Mutant Y277F : K_i obtenu par compétitions contre *t*-RA tritié

Fig. 45 : Ligands de la famille du CD2665 (CD2905 et CD2331) et de la famille du CD2668 (CD2815 et CD2817)

Tab. 9 : Affinités de liaison différentielles et activité de transactivation des mutants G301A, F302A, G303A et L266A

Fig. 46 : Détermination de l'activité antagoniste de ligands spécifiques par rapport à *t*-RA (10nM) sur le récepteur sauvage et les mutants hRAR α -F302A et -L266A en utilisant le gène reporteur TRE-pal-luc

Fig. 47 : Gly 301, Phe 302, Gly 303 et Leu 266 dans le site de liaison au ligand de hRAR α (Modélisation CIRD Galderma)